

Università degli studi di Napoli Federico II

Scuola Politecnica



Produzione e caratterizzazione di peptidi antimicrobici di origine umana

Dottorato XVIII Biologia Applicata



Tutor:

Dr. Eugenio

Notomista

Candidato:

Valeria

Sgambati

ANNO 2015/2016

Università Degli Studi di Napoli Federico II

INDICE	PAGINA
ABSTRACT	3
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	
1.1 Sistema immunitario	5
1.2 Immunità Innata	6
1.3 Effetti biologici sugli ospiti infettati con batteri gram-negativi	8
1.4 Peptidi antimicrobici	10
1.5 Identificazione di peptidi antimicrobici cationici (AMPs)	14
1.6 Apolipoproteina E	16
SCOPO	20
CAPITOLO 2: MATERIALE E METODI	
2.1 Peptidi sintetici	22
2.2 Ceppi Batterici	22
2.3 Condizioni di crescita e conservazione dei ceppi	22
2.4 Antibiotici	22
2.5 Vettori	23
2.6 Preparazione di cellule competenti	24
2.7 Trasformazione batterica	24
2.8 Espressione in <i>E.coli</i>	24
2.9 Purificazione della chimera ONCDCless-H6-(PM)-rApoEPM(133-150) e ONCDCless-H6-(PM)-rApoEPM(133-167)	25
2.10 Determinazione della concentrazione proteica	26
2.11 Saggi di attività antimicrobica	30
2.12 Saggio di proliferazione cellulare MTT	30
2.13 Dicroismo Circolare	31
2.14 Saggio di Emolisi	31
2.15 q RT-PCR	31
2.16 Saggio Elisa	33
2.17 Saggio di Griess	34
CAPITOLO 3: RISULTATI	
3.1 Clonaggio della proteina chimerica ONC-His-DPM-ApoE (133-150) e ONC-His-DPM-ApoE (133-167)	36
3.2 Espressione della proteina chimerica ONC-His-DPM-ApoE (133-150) e ONC-His-DPM-ApoE (133-167)	38
3.3 Attività antimicrobica di rApoE PM (133-150)	39
3.4 Attività antimicrobica di rApoE PM (133-167)	42
3.5 Caratterizzazione strutturale di rApoEPM(133-150) mediante dicroismo circolare	43
3.6 Caratterizzazione strutturale del peptide rApoE PM (133-167)	46
3.7 Saggi di citotossicità di rApoE PM (133-150)	49
3.8 Saggi di citotossicità di rApoE PM (133-167)	50

3.9 Saggi di emolisi rApoE PM (133-150) e rApoE PM (133-167)	52
3.10 Analisi delle proprietà immunomodulanti del peptide ApoE PM (133-150)	53
3.11 Analisi delle proprietà immunomodulanti del peptide ApoE PM (133-167)	58
3.12 Saggio di Griess	59
CAPITOLO 4: DISCUSSIONE	63
DISCUSSIONE	63
BIBLIOGRAFIA	65

ABSTRACT

I peptidi antimicrobici (AMPs) sono piccole molecole cationiche caratterizzate da un'elevata attività antimicrobica sia nei confronti di batteri Gram-negativi che Gram-positivi. In natura esistono molte proteine con funzione non strettamente correlata alla difesa dell'ospite, che possiedono al loro interno sequenze peptidiche antimicrobiche. Al riguardo in letteratura è noto il caso del peptide GKY-20, un peptide antimicrobico presente nella regione C-terminale della trombina umana. Negli ultimi anni l'attenzione è stata rivolta alla sintesi di peptidi derivanti dalla regione di legame al recettore dell'apolipoproteina E; tali peptidi, ottenuti in forma sintetica combinando corte sequenze amminoacidiche della regione sopradescritta, si sono dimostrati essere ottimi candidati nel trattamento di condizioni infiammatorie. In questo lavoro riportiamo la caratterizzazione strutturale e funzionale di due nuovi AMPs identificati in ApoE, il primo corrispondente ai residui 133-150 e il secondo ai residui 130-167. I risultati presentati evidenziano che questi peptidi, prodotti sia in forma eterologa che chimicamente, possiedono un ampio spettro di attività antimicrobica e la tendenza ad assumere una conformazione ad α -elica in presenza di agenti che mimano la membrana batterica, come TFE e SDS, o di polimeri caratteristici dei batteri Gram negativi come il lipopolisaccaride (LPS). E' importante inoltre notare che sia ApoE (133-150) che ApoE (130-167) non risultano essere tossici nei confronti di diverse linee cellulari umane e innescano una significativa risposta immunitaria innata, soprattutto Apo E (133-150), valutata sia come diminuzione dei livelli di espressione di citochine pro-infiammatorie in macrofagi umani (monociti THP-1 differenziati), sia valutata andando ad analizzare il rilascio di chemochine da parte cellule PBMC. Nel complesso, tali dati suggeriscono che questi peptidi potrebbero essere utilizzati come modello per la progettazione di nuove terapie immunomodulanti.



CAPITOLO 1: INTRODUZIONE



1.1 Sistema Imunitario

Tutti gli animali sono soggetti all'attacco di agenti patogeni e per questo motivo possiedono cellule o tessuti dedicate per affrontare le minacce d'infezione. Alcune di queste risposte si manifestano immediatamente in modo da contenere rapidamente un agente infettivo; altre invece sono più lente ed elaborate perché progettate su misura sulla base della natura dell'agente infettante. Collettivamente, questi sistemi di protezione costituiscono il sistema immunitario, complesso prodotto dell'evoluzione estremamente specializzato nella difesa dell'organismo dall'attacco di agenti estranei (antigeni).

Una caratteristica fondamentale del sistema immunitario è quella di distinguere tra strutture, endogene e/o esogene, che non costituiscono un pericolo e che possono essere preservate (*self*) da quelle, endogene e/o esogene che invece si dimostrano nocive per l'organismo e che devono quindi essere eliminate (*non self*). Secondo le più recenti teorie sul sistema immunitario, si distingue un *non-infectious self* da un *infectious self*. La discriminazione tra *self* e *non self* avviene a livello molecolare ed è mediata da peculiari strutture cellulari: i recettori *Tool-like*, i recettori dei linfociti T, il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) e gli anticorpi, che consentono il riconoscimento specifico di componenti chiave dell'agente lesivo.

I principali tipi di cellule del sistema immunitario dell'uomo sono mostrati in figura 1.

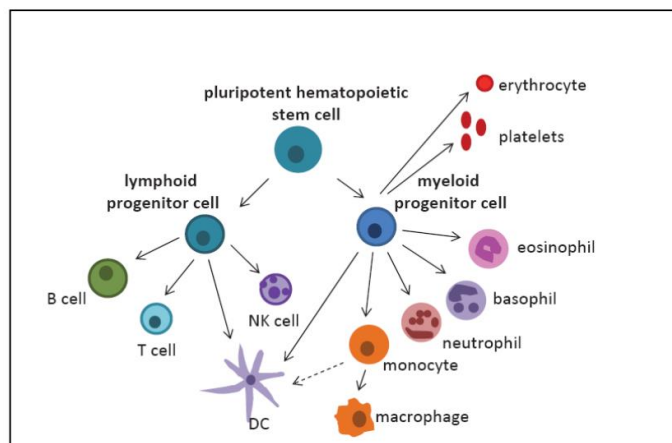


Fig 1: Cellule del sistema immunitario umano I Leucociti si differenziano da cellule staminali pluripotenti ematopoietiche e si differenziano nella linea linfoide e mieloide. Le cellule T, B, cellule Natural Killer (NK) e le cellule dendritiche (DC) si differenziano dai progenitori linfoidi. Monociti Macrofagi Granulociti da progenitori mieloidi (Da Pontynen N "Of Tolerance in mice and men –studies in APECED and AIRE" 2008).

Sulla base delle modalità di riconoscimento degli antigeni, si possono distinguere due aree del sistema immunitario:

- ✓ immunità innata
- ✓ immunità adattativa

Il sistema immunitario innato è costituito da neutrofili, basofili, eosinofili, monociti macrofagi e cellule *natural killer* (NK). Anche il sistema del complemento è un componente fondamentale dell'immunità innata.

La risposta immunitaria adattativa coinvolge i linfociti T e B, che attraverso i loro recettori (TCR e BCR) riconoscono i determinanti antigenici. Questi recettori sono generati attraverso riarrangiamenti somatici del DNA che garantiscono la formazione di una molecola unica per ogni singolo clone linfocitario. L'espansione di un clone linfocitario in seguito all'incontro con l'antigene garantisce il mantenimento della memoria immunitaria e la maggiore rapidità delle successive risposte a un determinato patogeno.

1.2 Immunità innata

Questo tipo di immunità è filogeneticamente il più antico; è presente fin dalla nascita, non necessita di un precedente contatto con la sostanza lesiva e non dà luogo a memoria immunitaria. Questo sistema rappresenta la prima vera barriera di difesa dell'organismo agli agenti patogeni.

Le principali cellule effettrici dell'immunità innata sono i neutrofili, i fagociti mononucleati e le cellule *natural killer* (NK). Queste cellule attaccano i microrganismi che hanno superato la barriera epiteliale e si sono introdotti nei tessuti o nel torrente ematico. Ognuno di questi tipi cellulari svolge un ruolo distinto. Alcune tra le cellule coinvolte, soprattutto i macrofagi e le cellule NK, liberano citochine che attivano i fagociti e stimolano la reazione cellulare dell'immunità innata, chiamata infiammazione (o flogosi).

L'infiammazione consiste nel reclutamento di leucociti, nella fuoriuscita di varie proteine plasmatiche nella sede d'infezione e nell'attivazione dei leucociti, con conseguente produzione di proteine coinvolte nell'eliminazione dell'agente infettante. È noto che la superficie epiteliale, se intatta, forma una barriera fisica tra l'ambiente esterno e i tessuti dell'ospite. Le tre interfacce principali dell'ospite con l'ambiente sono la cute, le superfici mucose dei tratti intestinali e le superfici dell'apparato respiratorio, tutte protette da un rivestimento epiteliale continuo che previene l'ingresso dei microrganismi.

Le barriere epiteliali e le cavità sierose contengono, inoltre, alcuni tipi di linfociti, compresi i linfociti T intraepiteliali e i linfociti B del sottogruppo B-1, rispettivamente, che riconoscono e rispondono ai microrganismi più comuni.

Queste sottopopolazioni si distinguono soprattutto per il tipo di recettore che esprimono per l'antigene (TCR). Alcuni linfociti T intraepiteliali

esprimono la forma convenzionale $\alpha\beta$ del TCR, presente nella maggior parte delle cellule T dei tessuti linfoidei. Altri esprimono una forma di recettore per l'antigene detta $\gamma\delta$, che può riconoscere antigeni peptidici e non peptidici. I linfociti intraepiteliali possono agire nella difesa dell'ospite secernendo citochine, attivando i fagociti e uccidendo le cellule infettate. Invece, molte cellule B-1 producono anticorpi IgM specifici per antigeni polisaccaridici e lipidici, come la fosforilcolina e l'LPS, molto comuni in diversi batteri. Una terza popolazione di cellule presenti in molti epiteli nelle cavità sierose è quella dei mastociti. Questi rispondono direttamente ai microbi e a vari mediatori secernendo sostanze che stimolano la flogosi.

Il sistema immunitario viene stimolato all'attività in seguito al rilascio di specifiche tossine da parte dei batteri Gram negativi e Gram positivi.

Si distinguono due tipologie di tossine batteriche:

- ✓ endotossine (es. lipide A del lipopolisaccaride), solo per i Gram-negativi
- ✓ esotossine (proteine rilasciate nell'ambiente extracellulare dal batterio patogeno).

Esotossine

Proteine solubili secrete dai batteri Gram-positivi e Gram-negativi durante la fase di crescita esponenziale. Sono funzionalmente simili agli enzimi ed hanno azione specifica. Sono superantigeni: possono causare una forte risposta immunitaria poiché possono stimolare la proliferazione dei linfociti T tramite interazione con MHC2 (complesso maggiore di istocompatibilità o *Major Histocompatibility Complex*) con conseguente produzione di IL1 (interleuchina-1) e TNF (*Tumor Necrosis Factor* o Fattore di Necrosi Tumorale) che causano il danno associato con queste tossine.

Endotossine

L'endotossina più comune è il lipide A, costituente del lipopolisaccaride (LPS), componente della parete cellulare dei batteri Gram-negativi (es. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus* ecc.). L'LPS è il componente principale della membrana esterna dei batteri Gram-negativi, e contribuisce notevolmente all'integrità strutturale dei batteri, aumentandone la carica netta negativa e stabilizzando la struttura della membrana stessa [1]. Alcuni lavori hanno evidenziato che il rilascio di LPS da parte di batteri Gram-negativi non richiede necessariamente la distruzione della parete cellulare batterica, ma piuttosto, nella normale attività fisiologica, l'LPS è secreto dalla membrana esterna batterica sotto forma di vescicole, che possono anche contenere altri fattori di virulenza e proteine.

Una molecola di LPS comprende tre parti:

- antigene O (o polisaccaride O)
- Oligosaccaride *core*
- Lipide A

La catena polisaccaridica contenuta in un LPS è detta l'antigene-O o polisaccaride-O. L'antigene O è attaccato all'oligosaccaride *core*, e costituisce il dominio più esterno della molecola. La composizione della catena O varia da ceppo a ceppo.

Il *core* contiene sempre una componente oligosaccaridica che si collega direttamente al lipide A e comunemente contiene zuccheri caratteristici.

Il Lipide A, la porzione più conservata degli LPS, è un disaccaride di glucosammina legato a 1 o 2 gruppi fosfato e 4-6 acidi grassi. Gli acidi grassi idrofobici ancorano l'LPS alla membrana batterica. Il lipide A è responsabile di gran parte della tossicità dei batteri Gram-negativi. Quando le cellule batteriche sono lisate dal sistema immunitario, frammenti di membrana, contenenti lipide A vengono rilasciati in circolo, causando febbre, diarrea, e nei casi più estremi la cosiddetta sindrome da shock settico che può anche risultare fatale [2].

1.3 Effetti biologici sugli ospiti infettati con batteri gram-negativi

L'LPS funge da prototipo delle endotossine perché si lega al complesso di recettori CD14 / TLR4 / MD2 in molti tipi di cellule, ma soprattutto nei monociti, nelle cellule dendritiche, nei macrofagi e nelle cellule B, promuovendo la secrezione di citochine pro-infiammatorie, ossido di azoto e eicosanoidi. [3] Come parte della risposta allo stress cellulare, il super-ossido è una delle principali specie di ROS (specie reattive dell'ossigeno) indotta da LPS in vari tipi di cellule che esprimono TLR.

La funzione dell'LPS è da diversi anni oggetto di intensi studi grazie al suo interessante ruolo nell'attivazione di molti fattori di trascrizione. LPS produce anche molti tipi di mediatori coinvolti nello shock settico [4].

Le endotossine sono in gran parte responsabili delle drammatiche manifestazioni cliniche delle infezioni da batteri Gram-negativi patogeni, come il caso di *Neisseria meningitidis*, agente patogeno che causa meningococcemia, la sindrome di Waterhouse-Friderichsen e la meningite.

E' stato dimostrato che alcune porzioni di LPS di diversi ceppi batterici sono chimicamente simili alle molecole di superficie cellulare dell'ospite umano; la capacità di alcuni batteri di presentare molecole sulla loro superficie chimicamente identiche o simili alle molecole superficiali di alcuni tipi di cellule ospiti è definito mimetismo molecolare [5].

I Recettori *Toll-like* del sistema immunitario innato riconoscono LPS e innescano una risposta immunitaria.

Gli antigeni O rappresentano la parte più variabile dell'LPS e determinano la specificità antigenica. Il lipide A al contrario è la parte più conservata. Tuttavia, la composizione del lipide A può anche variare (ad esempio in numero e natura delle catene aciliche tra generi diversi o addirittura anche all'interno dello stesso genere). Alcune di queste variazioni possono conferire proprietà antagoniste all'LPS. I *cluster* di geni codificanti i componenti dell'LPS sono molto variabili tra diversi ceppi, sottospecie e specie di batteri patogeni di piante e animali [6].

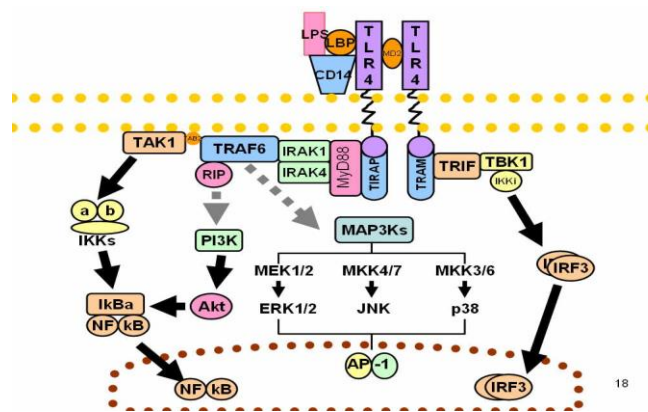


Fig.2: Rappresentazione schematica dei recettori *Toll-like* del sistema immunitario innato che riconoscono LPS e innescano la risposta immunitaria

1.4 Peptidi antimicrobici

A causa dell'allarmante aumento della resistenza agli antibiotici da parte dei microorganismi, negli ultimi anni l'interesse scientifico verso agenti antimicrobici alternativi è aumentato notevolmente. A tal riguardo, come dimostrato dalla recente letteratura scientifica, particolare interesse è rivolto allo studio dei peptidi antimicrobici (AMPs - *antimicrobial peptides*).

Gli AMPs sono piccole molecole peptidiche di lunghezza variabile, dai 10 ai 50 amminoacidi. Essi rappresentano la prima linea di difesa degli organismi contro una grande varietà di agenti esterni [7]. Gli AMPs hanno un ampio spettro di azione e agiscono a livello delle membrane cellulari batteriche con meccanismi diversi da quelli dei comuni farmaci. Proprio in virtù del loro bersaglio molecolare, ovvero le membrane per le quali è particolarmente complesso modificarne geneticamente la composizione, difficilmente i batteri riescono a sviluppare meccanismi di resistenza nei confronti degli AMPs [8,9].

Oltre all'attività antimicrobica, molti AMPs presentano proprietà biologiche accessorie tra le quali attività antivirale [9], antimicotica [10] antitumorale [11] e immunomodulatoria [12,13].

Negli ultimi anni numerosi peptidi antimicrobici sono stati caratterizzati e isolati da vari organismi come piante, invertebrati, anfibi e mammiferi. In molti di questi organismi, la protezione agli agenti patogeni tramite immunità innata è soprattutto mediata dagli AMPs, spesso mascherati in proteine con funzioni non necessariamente correlate a meccanismi di difesa dall'ospite.

Diverse sono le caratteristiche che rendono i peptidi antimicrobici potenziali strumenti terapeutici:

- ✓ specificità verso le cellule procariotiche;
- ✓ ampio spettro d'azione contro virus, batteri, funghi e protozoi;
- ✓ sinergie con gli antibiotici convenzionali e con altri peptidi antimicrobici;
- ✓ efficacia contro batteri resistenti agli antibiotici;

Il sistema di difesa mediato dagli AMPs è sempre più oggetto di intensi studi. Tra gli AMPs meglio caratterizzati vanno annoverate le defensine e le catelicidine, membri rappresentativi di due famiglie di peptidi strutturalmente distinte. Le defensine sono piccoli peptidi cationici, prodotti dalle cellule epiteliali delle mucose, dai leucociti, dalle cellule NK e dai linfociti T citotossici. Questi peptidi sono tossici per i microbi, compresi funghi e batteri, e attivano le cellule coinvolte nelle risposte infiammatorie. Le catelicidine sono proteine presenti nel sistema immunitario innato dei mammiferi, che in seguito a un

taglio liberano due frammenti, uno dei quali, denominato LL-37 estremamente tossico perché in grado di neutralizzare l'LPS. Tali proteine sono espresse dai neutrofili e da vari epiteli di barriera, incluse la cute, le cellule della mucosa gastrointestinale e le cellule della mucosa respiratoria.

Queste molecole hanno molteplici funzioni protettive contro le infezioni: sono tossiche per un'ampia gamma di microrganismi, attivano nei leucociti e in altri tipi cellulari varie risposte microbicide e neutralizzano l'LPS [14].

La specificità degli AMPs verso le cellule procariotiche rispetto alle cellule eucariotiche, è una caratteristica molto importante. Il peptide è in grado di agire in maniera selettiva sulle membrane in quanto ci sono delle differenze di carica e di composizione tra quelle degli eucarioti e quelle dei procarioti. Le membrane cellulari batteriche risultano infatti formate principalmente da una notevole quantità di fosfolipidi carichi negativamente, quali fosfatidilserina, fosfatidilglicerolo e bisfosfatidilglicerolo [15], mentre le membrane delle cellule eucariotiche sono composte da fosfatidilcolina, sfingomieline e colesterolo, tutte molecole che a pH fisiologico presentano carica neutra [16].

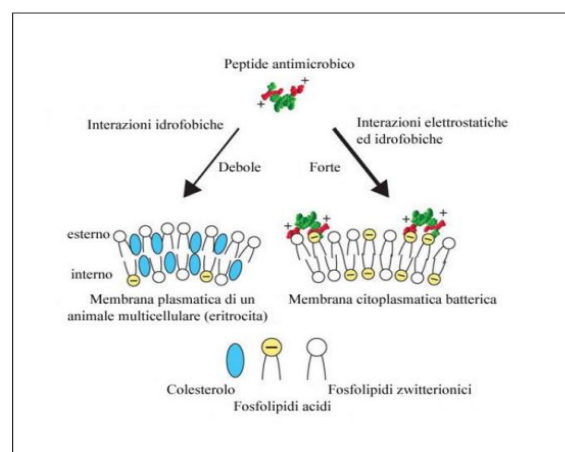


Fig. 3: Differenza nella composizione della membrana citoplasmatica di organismi eucariotici e procariotici. A tali differenze è imputabile il meccanismo di selettività dei peptidi antimicrobici

La maggior parte degli AMPs possiede una carica netta positiva dovuta alla presenza di specifici residui cationici distribuiti lungo la catena peptidica. Tale carica netta positiva consente ai peptidi di interagire, mediante

un'interazione elettrostatica, con i fosfolipidi carichi negativamente presenti sulle membrane delle cellule batteriche [17,18,19]. Sebbene l'azione degli AMPs risulti selettiva, essa può essere considerata ad ampio spettro poiché si esplica su un'ampia gamma di organismi, batteri Gram-positivi e Gram-negativi, ma anche su virus, funghi e protozoi patogeni e persino contro cellule tumorali [20].

Negli ultimi decenni ha rivestito molta importanza lo studio del meccanismo d'azione degli AMPs; tali studi hanno portato alla consapevolezza che la composizione lipidica della membrana batterica potrebbe modulare l'interazione dei peptidi con le membrane stesse modificandone le caratteristiche chimico-fisiche. Si ipotizza al riguardo che tra i peptidi e la superficie della membrana batterica si verifichi un'associazione determinata da interazioni elettrostatiche [21]. Tali interazioni dipendono dalla tipologia di amminoacidi (anionici o cationici) della sequenza peptidica, e dalla struttura della superficie batterica che risulta infatti differente tra i batteri Gram-positivi che possiedono una capsula polisaccaridica e acidi teicoici e lipoteicoici, e i batteri Gram-negativi con fosfolipidi anionici e lipopolisaccaridi (LPS). Quando le interazioni elettrostatiche non si possono instaurare a causa dell'elevata distanza tra i gruppi carichi, la struttura secondaria del peptide (α -elica o β -foglietto) può rivestire un ruolo importante. Molti peptidi assumono una specifica conformazione in prossimità della membrana batterica mediante un meccanismo di ripartizione-ripiegamento, mentre restano non strutturati in soluzione. Tale comportamento suggerisce la possibilità che possa instaurarsi un'interazione specifica tra il peptide e la membrana batterica, dovuta alla struttura anfipatica del peptide stesso [22], alla perdita di potenziale elettrico negativo della membrana che porta alla formazione di canali ionici [23,24,25], o all'attivazione di idrolasi che degradano la parete cellulare [26]. Sono stati sviluppati diversi modelli di interazione tra i peptidi e le membrane (vedi fig. 4).

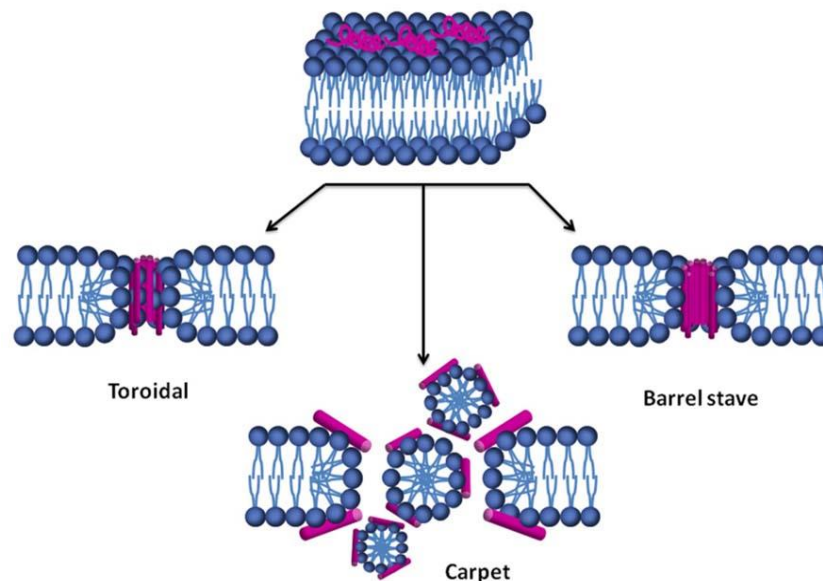


Fig.4: Possibili meccanismi d’azione dei peptide ad attività antimicrobica. (Oren, Z. & Shai, Y. 1998).

Il modello “*barrel-stave*” ipotizza la formazione di pori nel cuore idrofobico della membrana, che si formano in seguito a un assemblaggio circolare dei peptidi che tendono a orientare i loro domini idrofobici verso le catene lipidiche della membrana.

Il modello “*carpet-like*” ipotizza inizialmente un’associazione del peptide con la superficie della membrana seguita da interazioni elettrostatiche del peptide con i fosfolipidi anionici della membrana che determinerebbero la rottura dell’impaccamento lipidico e il disfacimento della struttura [27].

Il modello “*toroidal pore*”, prevede anch’esso la formazione iniziale di pori nella membrana, solo che in questo caso i fosfolipidi successivamente si curvano completamente nel doppio strato, alternandosi da un lato all’altro e interagendo con le teste polari. In questo processo le due superfici del doppio strato diventano una struttura continua [28].

1.5 Identificazione di peptidi antimicrobici cationici

Negli eucarioti multicellulari è documentata con sempre maggiore frequenza l'identificazione di proteine, con funzioni non necessariamente correlate alla difesa dell'ospite, come potenziali fonti di AMPs "criptici", tra cui l'emoglobina, la trombina, lattoferrina, lisozima, proteine iston-like, ribonucleasi e apolipoproteine [29,30,31]. Queste proteine, denominate proteine rilascianti i AMPs (AMPs-RP da *AMP releasing protein*), rilascerebbero questi peptidi biologicamente attivi in seguito ad eventi proteolitici catalizzati da proteasi batteriche e/o dell'ospite.

Recentemente, il nostro gruppo ha sviluppato un metodo bioinformatico [32] attraverso il quale è possibile identificare AMP all'interno di precursori proteici e di predirne quantitativamente la loro attività in relazione a uno specifico ceppo. Questo metodo assegna un punteggio (*score*) ai peptidi, in base alla loro carica netta, idrofobicità e lunghezza; questo punteggio, se rientra in un intervallo limitato (6.5-9.5), è proporzionale all'attività antimicrobica del peptide identificato. Punteggi inferiori a 6.5 possono essere considerati non significativi in quanto corrispondono a valori di MIC ipotetici (*Minimum Inhibitory Concentration*) superiori a 200 μ M. Per punteggi superiori a 10 la relazione di linearità non è più valida, ovvero un aumento del punteggio non corrisponde necessariamente a un aumento dell'attività antimicrobica. Analizzando la sequenza amminoacidica di una regione all'interno di un precursore proteico, i valori di punteggio ottenuti per vari peptidi identificati possono essere tracciati in funzione della loro lunghezza e posizione creando così una mappa accurata (plot isometrico) dei determinanti antimicrobici presenti in quella regione.

In figura 5 sono mostrati solo alcuni AMPs, non noti in letteratura, identificati mediante tale sistema bioinformatico.

ApoE (133-150) and (133-167): *identificate nell'apolipoproteina E umana (299 aa)*

LRVRLASHIRKIRKRLIR
LRVRLASHIRKIRKRLIRDAADDLQKRLAVYQAGAR

ApoB (887-911) and (887-925): *identificate nell'apolipoproteina umana B100 (4536 aa)*

HVALKPGKIKFTIIPSPKRPVKLLISG
HVALKPGKIKFTIIPSPKRPVKLLISGGNTLHLVSTTKT

HF_beta (420-447) and (425-447): *identificate nella catena beta del fibrinogeno umano (447 aa)*

GVVWNNWKGSWYSMRKMSMKIRPFPPQQ
NWKGSWYSMRKMSMKIRPFPPQQ

HF_gamma (366-395): *identificata nella catena gamma del fibrinogeno umano (427 aa)*

GIIWATWKRWYSMKKTIIMKIIPFNRIITIG

PAP 3 (1-47), (1-25) and (26-47): *identificate nel pepsinogeno 3 umano (373 aa)*

IMYKVPILIRKKSILRRTLSEGLIKDFTLKKHINLPARKYFPQWKAPTIL
IMYKVPILIRKKSILRRTLSEGLIKD
FTLKKHINLPARKYFPQWKAPTIL

H11_beta (235-261): *identificata nella proteina simile all'idrossisteroide 11-beta deidrogenasi umana (271 aa)*

GVFYPPWRFRLLCLLRRWLPRPRAWFTIR

HI_beta (111-166): *identificata nell'interferone beta umano (166 aa)*

FTRGKILMSSILHDKRYYGRIILHYLKAKKEYSHCAWTIVRVEILRNFFYFIMRLTGILRN

Fig.5: Rappresentazione di alcuni peptidi antimicrobici di origine umana identificati con il sistema bioinformatico messo a punto dal Dott. Notomista (Pane et al. 2016 submitted). Codici di colore: rosso - residui acidi (D, E); verde - residui idrofobici (L, I, V, A, M, W, F, Y, C); blu - residui di base (R, K, H); giallo - residui idrofilici (Q, N, S); grigio - residui *borderline* (G, T, P)

1.6 Apolipoproteina E

Tra le proteine umane maggiormente studiate come potenziale fonte di peptidi antimicrobici, un posto di rilievo è certamente occupato dall'apolipoproteina E. L'apolipoproteina E (ApoE) è una nota proteina glicosilata che svolge un ruolo chiave nel trasporto del colesterolo e di altri lipidi nel sangue e del sistema nervoso centrale. ApoE è prevalentemente sintetizzata nel fegato, e in minori quantità anche nel cervello, nella milza, nei polmoni, nei reni, nelle ovaie, nei testicoli, nei nervi periferici e nei tessuti muscolari [33]. Oltre al suo ruolo nel trasporto dei lipidi, diversi studi hanno dimostrato la sua importanza nella patogenesi dell'aterosclerosi [34], in patologie neurodegenerative come l'Alzheimer e il morbo di Parkinson [35], e malattie autoimmuni come la sclerosi multipla [36] e la psoriasi [37]. In aggiunta a questi ruoli ben definiti, ApoE ha anche proprietà immunomodulanti. Infatti, è stato osservato che ApoE è in grado di indurre un fenotipo antinfiammatorio nei macrofagi [38], sopprimere la proliferazione delle cellule T [39,40], indurre l'aumento della produzione di ossido nitrico nelle piastrine [41], e facilitare il riconoscimento dell'antigene da parte delle molecole di lipidi CD1 sulle cellule T natural killer [42].

Queste proprietà immunomodulanti sembrano essere biologicamente rilevanti, dal momento che gli animali ApoE-deficienti presentano una alterata l'immunità dopo l'esposizione alla *Listeria monocytogenes* e sono più suscettibili a endotossemia dopo l'inoculazione con LPS o *Klebsiella pneumoniae* [43,44]. Queste osservazioni suggeriscono che ApoE ha importanti funzioni biologiche indipendenti del suo ruolo canonico di trasporto. Vari enzimi, come catepsina D, trombina e serina proteasi chimotripsina simili sono stati proposti come potenziali mediatori dell'idrolisi di ApoE [45]. Frammenti di ApoE sono stati rilevati nel cervello e nel liquido cerebrospinale di pazienti con malattia di Alzheimer e sono in grado di causare neurotossicità in specifiche condizioni sperimentali [46]. Inoltre, studi condotti su peptidi sintetici progettati sulla proteina intera hanno evidenziato effetti neurotossici simili a quella della proteina intatta, oltre a varie altre funzioni biologiche, tra cui attività antimicrobica e antinfiammatoria. Diversi studi su ApoE si sono concentrati sulla regione di legame al recettore [47,48,49], che si trova tra i residui 130-162 (Figura 6A); questa regione risulta essere di fondamentale importanza per le sue attività biologiche.

La struttura cristallina di ApoE dimostra che questa regione si ripiega in una lunga α -elica anfipatica (Figura 6B) all'interno di un gruppo di quattro eliche (residui 24-167) che caratterizza il *folding* del dominio N-terminale di ApoE [50,51,52]. Alcuni studi hanno dimostrato che i peptidi sintetici che coprono la regione di affinità recettoriale di ApoE conservano l'attività biologica della proteina intatta. Ad esempio, il peptide ApoE (133-149), noto anche come "COG-133" e caratterizzato da modifiche chimiche ad entrambe le estremità

(acetilazione e ammidazione), presenta caratteristiche farmacologiche, tra le quali l'attività antinfiammatoria e neuroprotettiva [53,54]. Altri studi, condotti su un gruppo di peptidi sintetici, monomerici e dimerici, progettati sulla base della regione amminoacidica 130-169 di ApoE [47], hanno evidenziato che gli effetti di citotossicità erano strettamente correlati al contenuto in α -elica di questi peptidi e in particolare al contributo degli amminoacidi carichi positivamente presenti nella regione 141-149.

Azuma e collaboratori hanno dimostrato che un peptide corrispondente ai residui 133-162 presentava un ampio spettro attività antimicrobica [55]. Nella stessa regione, Forbes e collaboratori hanno utilizzato un approccio *in silico* per identificare un gruppo di 9-residui, da Leu-141 a Leu-149 che, quando sintetizzato chimicamente in forma di un peptide ripetuto in tandem denominato ApoEdp (Figura 6C), presentava una significativa attività antimicrobica che invece era assente nel solo peptide costituito solo da 9 residui [48]. Più di recente un nuovo peptide (chiamato ApoE23) è stato progettato, unendo frammenti sintetici 141-148 e 135-149 (Fig. 6C). In maniera analoga ad ApoEdp, ApoE23 presenta due moduli ripetuti solo che in quest'ultimo è stata interposta tra le due ripetizioni una sequenza di cinque residui (RLASH). Gli autori dimostrarono che ApoE23 presentava effetti immunomodulatori sulle cellule THP-1 e attività antimicrobica di poco superiore a ApoEdp [49].

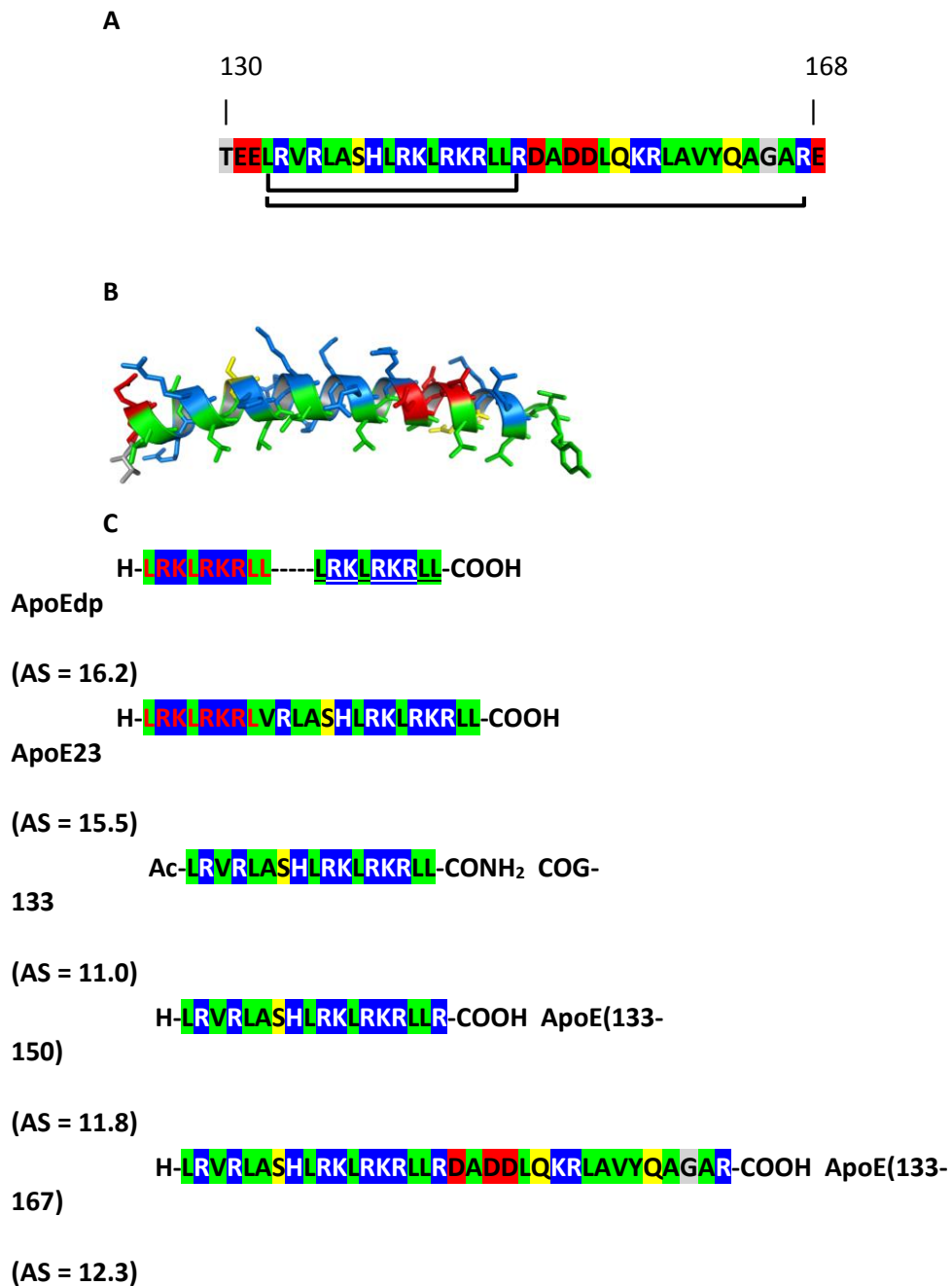


Fig.6: Analisi della regione 130-168 dell'apolipoproteina E umana.

A. Sequenza della regione 130-168 dell'apolipoproteina E; Le regioni 133-167, e 133-150 identificate come potenziali CAMP sono sottolineate.

B. Struttura cristallografica della regione 130-162 (codice PDB: 1B68).

C. Sequenze dei peptidi descritti nel testo.

In tutti i pannelli lo stesso codice di colore è stato utilizzato: rosso indica residui acidi (D , E) ; verde i residui idrofobici (L , I , V , A , M , W , F , Y , C) ; blu i residui di base (R , K , H) ; giallo residui idrofilici (Q , N , S) ; grigio , residui borderline (G , T , P)

Il sistema bioinformatico sopra menzionato ha permesso di identificare nella regione di *binding* al recettore di ApoE due sequenze, ApoE (133-167) e ApoE (133-150), che corrispondono al massimo assoluto e a un massimo relativo nel grafico di *score* antimicrobico. In figura 7 è riportato il grafico isometrico relativo alla regione 123-168 di ApoE dove, oltre ad ApoE (133-150) e ApoE (133-167), sono evidenziati altri 2 peptidi, noti in letteratura, come COG-133 e Apo E (133-162).

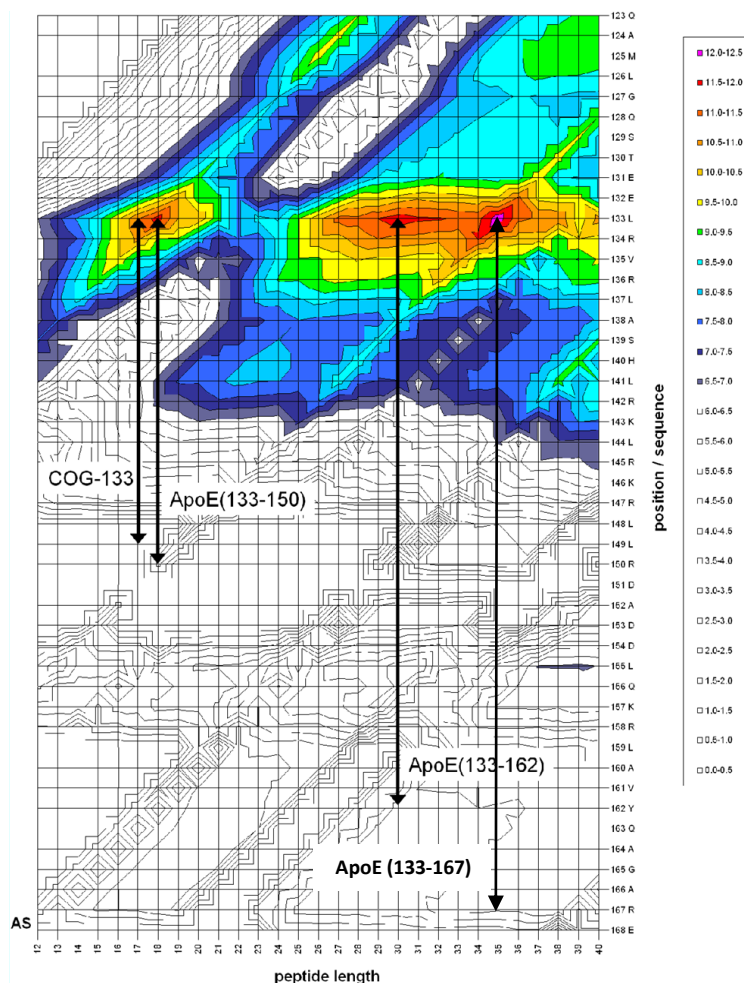


Fig.7: Plot isometrico di possibili peptidi antimicrobici analizzati nella regione 123-168 di ApoE. I dati ottenuti sono relativi a parametri ottimizzati per il ceppo *S. aureus* C623. I colori sono stati usati per evidenziare il punteggio dei valori di attività antimicrobica superiori a 6.5 , corrispondenti a MIC teoriche inferiori a 200 μ M.

SCOPO

In tale contesto si colloca il presente lavoro di tesi che è stato incentrato sulla caratterizzazione delle proprietà funzionali e strutturali dei peptidi ApoE_{PM} (133-150) e ApoE_{PM} (133-167). In figura 6 è rappresentato il confronto tra le sequenze dei peptidi ApoEdp, ApoE23, COG-133, ApoE (133-150) e ApoE_{PM} (133-167). Sulla base dei dati di letteratura relativi ai peptidi ApoEdp, ApoE23 e COG-133 e dei valori di *score* ricavati, compresi quelli relativi ai peptidi ApoE (133-150) e ApoE (133-167), si è ipotizzato che questi potrebbero avere un'attività antimicrobica comparabile ai peptidi di letteratura ApoEdp e ApoE23 (ottenuti per sintesi ricombinando in tandem specifiche sequenze di ApoE) mantenendo al contempo inalterate le proprietà farmacologiche che invece sono state evidenziate per COG-133. Su tali considerazioni si fonda quindi questo studio, che ha previsto inoltre anche la messa a punto di un protocollo di produzione ricombinante dei peptidi, uno dei quali recentemente inserito in una pubblicazione [32].



CAPITOLO 2:

MATERIALE E METODI



2.1 Peptidi sintetici

I peptidi utilizzati in questo studio sono stati sintetizzati da Thermo Fisher Scientific GmbH (Ulm , Germania) o Peptide 2.0 (Chantilly , in Virginia. USA) con fase *solida di carbonile 9–fluorenylmethoxy* (Fmoc) con un terminale carbossilico libero e purificato per una purezza > 95 % con cromatografia liquida ad alte prestazioni *reversephase* (HPLC). Le masse dei peptidi sono state confermate da esperimenti di spettrometria di massa.

2.2 Ceppi Batterici

E.coli ceppo BL21(DE3). Il ceppo è stato acquistato dalla AMS biotechnology (Oxon, UK). Nel genoma di tale ceppo è presente il gene per l'RNA polimerasi del fafo T7 che consente la trascrizione di sequenze clonate in vettori procariotici sotto il controllo del promotore della polimerasi.

2.3 Condizioni di crescita e conservazione dei ceppi

Per la crescita e il mantenimento dei ceppi ricombinanti di *E.coli* è stato utilizzato il terreno Luria-Bertani (LB), la cui composizione per litro di soluzione è: triptone 10 g, estratto di lievito 5 g, NaCl 10 g. L'antibiotico ampicillina è stato aggiunto a concentrazione finale di 100 µg/ml. La sterilizzazione del terreno di coltura è avvenuta mediante trattamento in autoclave per 20 minuti alla temperatura di 121°C. La conservazione delle cellule a lunga durata è stata effettuata a -80°C in terreno LB addizionato con glicerolo (20%). Per la crescita dei microrganismi in terreno liquido sono state utilizzate beute a un rapporto volume/terreno di 1:4, garantendo così un'adeguata ossigenazione della coltura. La coltura batterica è stata incubata in un oscillatore orbitare a 180 g a una temperatura di 37°C.

2.4 Antibiotici

L'ampicillina è stata usata a una concentrazione finale nei mezzi di coltura pari a 100µg/ml.

2.5 Vettori

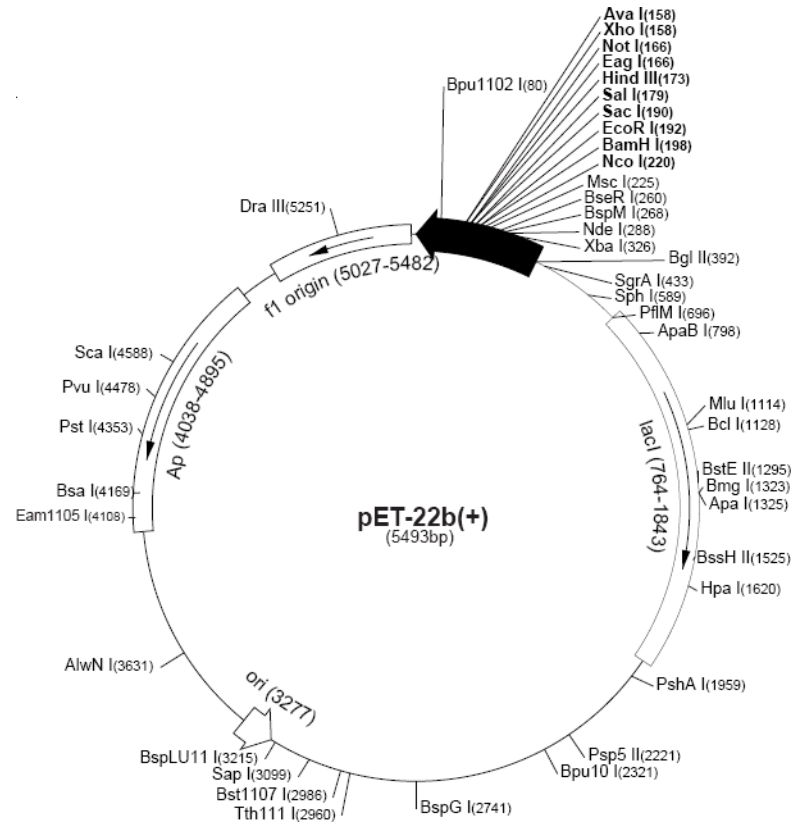


Fig.7: vettore di espressione Pet-22b⁽⁺⁾

Il vettore di espressione pET-22B⁽⁺⁾ (Fig.7) contiene un gene per la resistenza all'ampicillina, un'origine di replicazione batterica necessaria per la sua propagazione nelle cellule di *E.coli*, Il gene lac I, codificante per il repressore dell'operone lattosio e un polinker clonato a valle del promotore di T7; all'interno del promotore inoltre è presente la sequenza lac O, alla quale si lega il repressore. Il legame del repressore al promotore non permette l'attacco della polimerasi impedendo dunque l'espressione dei geni clonati. Tale inibizione viene superata attraverso l'aggiunta di isopropil- α -tiogattoside (IPTG) al mezzo di coltura. L'IPTG è un analogo del galattosio non metabolizzabile dai batteri; una volta entrato nella coltura, esso si lega al repressore dell'operone del lattosio inducendo il distacco dal promotore del fago T7.

2.6 Preparazione di cellule competenti

Per la preparazione di cellule competenti batteriche, una colonia di cellule è stata trasferita dopo una notte di crescita a 37°C su un terreno solido in 5 ml di terreno liquido e lasciata in agitazione a 37°C fino a OD_{600nm} pari a 0,6. Le cellule sono poi state centrifugate per 5 minuti a 3500 rpm a 4°C e il sedimento risultante è stato poi risospeso in 5ml di una soluzione di cloruro di magnesio 100 mM freddo. La sospensione è stata poi centrifugata per 5 minuti a 3500 rpm a 4°C ed il sedimento cellulare è stato risospeso in 10 ml di cloruro di calcio 100 mM freddo e incubato in ghiaccio per 60 minuti. Infine, dopo un'ulteriore centrifuga il nuovo sedimento cellulare è stato risospeso in 3 ml di cloruro di calcio 85 mM contenente glicerolo al 15%. Dopo tale procedura sono state preparate aliquote di 100 µl di sospensione cellulare successivamente conservate a -80°C. Tutte le operazioni sono state condotte in condizioni di sterilità.

2.7 Trasformazione batterica

Le cellule di *E. coli* competenti sono state trasformate utilizzando 50 ng di plasmide ricombinante e poste in ghiaccio per 60 minuti. Sono state poi incubate a 42°C per 2 minuti e rimesse subito in ghiaccio. Dopo l'aggiunta di 1 ml di LB, le cellule sono state incubate a 37°C per 45 minuti e quindi centrifugate per 3 minuti a 5000 rpm (centrifuga Thermo Espresso, Electron Corporation). Dopo aver eliminato il surnatante, il sedimento è stato risospeso nel volume rimanente (circa 200 µl) e piastrato su LB-agar in presenza di ampicillina.

2.8 Espressione in *E.coli*

Per l'espressione delle proteine chimeriche si è proceduto all'inoculo di una colonia di cellule ricombinanti (cresciute per la notte a 37°C) in 250 ml di terreno LB contenente ampicillina. La sospensione batterica è stata quindi incubata sotto agitazione a 37°C; dopo aver raggiunto la densità ottica di 0,4-0,7, l'espressione di ONC-His-rApoE_{PM}(133-150) o di ONC-His-rApoE_{PM}(133-167) è stata indotta con IPTG ad una concentrazione finale di 0,4 mM. Come controllo, è stata prelevata prima dell'induzione un'aliquota cellulare di 1ml. La coltura è stata poi fatta crescere per tre ore; al termine dell'incubazione è stata prelevata un'aliquota cellulare di 1ml. Allo scopo di valutare il grado di espressione delle due proteine chimeriche si è preceduto all'analisi mediante SDS-PAGE in condizioni riducenti delle due aliquote precedentemente isolate.

2.9 Purificazione della chimera ONCDCless-H6-(PM)-rApoEPM(133-150) e ONCDCless-H6-(PM)-rApoEPM(133-167)

Dopo verifica dell'espressione, l'intera coltura è stata centrifugata a 7000 rpm a 4°C per 15 minuti. Il sedimento ottenuto è stato risospeso per due volte in 20 ml di una soluzione di Tris- HCl 50Mm pH 7.4 contenente EDTA 20 mM e ogni volta centrifugato a 7000 rpm a 4°C per 15 minuti; il sedimento risultante è stato risospeso in 20 ml di Tris-HCl 0,1M pH 7.4 contenente EDTA 5mM e centrifugato a 7000 rpm a 4°C per 15 minuti. Infine il sedimento è stato risospeso in 10 ml di Tris-HCl 0,1 M Ph 7.4 contenente EDTA e inibitori delle proteasi; la sospensione è stata sottoposta a sonicazione per 20 minuti (30'' ON, 30'' OFF). Il lisato è stato poi centrifugato a 12000 rpm a 4°C per 1 ora. Per la denaturazione dei corpi di inclusione il sedimento è stato risospeso in 10ml di Tris- HCl 0,1M Ph 7.4 contenente cloruro di guanidinio 6M. La sospensione è stata sottoposta a sonicazione per 20 min (30'' ON, 30'' OFF), in presenza di 10 Mm di β -marcaptoetanol. Dopo aver saturato la soluzione con azoto per 5 minuti è stata infine lasciata a temperatura ambiente per 16 ore in agitazione.

La soluzione denaturante è stata su Ni Sepharose [™] (GE Healthcare) per eseguire una cromatografia di affinità.

2.10 Determinazione della concentrazione proteica

Per la determinazione della concentrazione proteica di soluzioni omogenee è possibile rifarsi alla legge di Lambert-Beer, la quale pone la quantità di luce assorbita da una soluzione in funzione della sua concentrazione e della lunghezza del cammino ottico.

Per determinare invece la concentrazione proteica di soluzioni eterologhe, si applica un metodo indiretto utilizzando reattivi in grado di legarsi alle proteine e di sviluppare colorazioni misurabili mediante uno spettrofotometro.

Esistono diversi metodi colorimetrici che permettono di effettuare una quantificazione delle proteine presenti in una soluzione. Il principio base di questi kit consiste sul legame che si instaura fra certi ioni metallici/coloranti e le proteine, secondo uno specifico rapporto di massa. Questi complessi portano alla formazione di soluzioni intensamente colorate e caratterizzate da una specifica lunghezza d'onda d'assorbimento. Inoltre all'interno di uno specifico intervallo di concentrazione dell'analita, questi reagenti generano una banda di assorbimento la cui intensità è proporzionale alla concentrazione delle proteine in soluzione in unità di massa/volume (Copeland, 1994). In questo lavoro sono stati confrontati due metodi colorimetrici specifici per l'analisi di proteine: il Bradford e il BCA. Per tutti i metodi colorimetrici la scelta della proteina standard per la costruzione della retta di calibrazione influenza fortemente i risultati della concentrazione dell'analita proprio perché ogni proteina è costituita da una sequenza amminoacidica specifica e pertanto da una specifica risposta colorimetrica. Per questo motivo si consiglia di utilizzare come proteina standard una proteina che si avvicini il più possibile alle caratteristiche dell'analita preso in esame. Quando tutto ciò non è fattibile si usa generalmente la BSA.

BRADFORD

Questo metodo si basa sul legame che si crea tra le proteine ed il colorante Blu Brillante Coomassie G-250 (Fig.8). Nelle condizioni di pH previste dal metodo Bradford il colorante è presente sotto la sua forma cationica ed ha un'assorbanza specifica a 465 nm. Quando il colorante si lega ad una proteina si stabilizza la forma anionica doppiamente protonata del colorante, la quale ha il massimo di assorbimento a 595 nm, lunghezza d'onda che viene monitorata (Fig.8). Questa procedura è altamente riproducibile e rapida e il legame colorante-proteina mantiene una buona stabilità per circa un'ora.

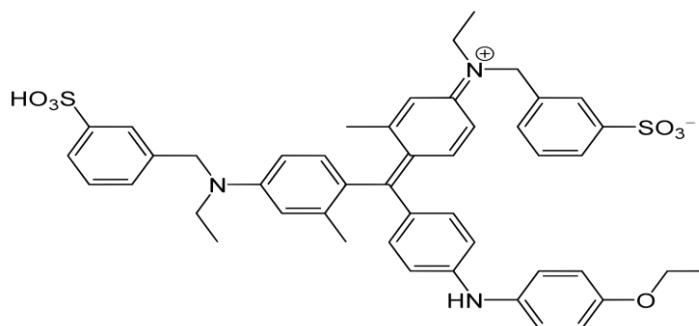


Fig.8: Struttura chimica del Blu Brillante Coomassie

L'attacco del colorante richiede una forma macromolecolare con alcuni gruppi funzionali reattivi. Le interazioni sono principalmente con l'arginina piuttosto che con i gruppi amminici primari; gli altri residui basici (His, Lys) e aromatici (Try, Tyr e Phe) danno una risposta meno intensa in termini di variazione colorimetrica. Il comportamento del legame che si forma tra colorante e proteina è attribuibile alle forze di Van der Waals ed alle interazioni idrofobiche (Compton, 1985). Uno dei maggiori vantaggi di questo metodo di analisi è che esso è relativamente insensibile a numerosi reagenti nei quali le proteine vengono comunemente solubilizzate, cationi come sodio o potassio e a carboidrati come il saccarosio. In particolare è meno sensibile rispetto al metodo BCA alle sostanze riducenti e a quelle chelanti. Gli unici reagenti che danno un'eccessiva interferenza sono per la maggior parte detergenti come SDS, Triton X-100 e detergenti commerciali per vetreria (Bradford, 1976). Le interferenze si spiegano in termini dell'effetto che hanno i composti sull'equilibrio tra le tre forme del colorante (anionico, cationico e neutro).

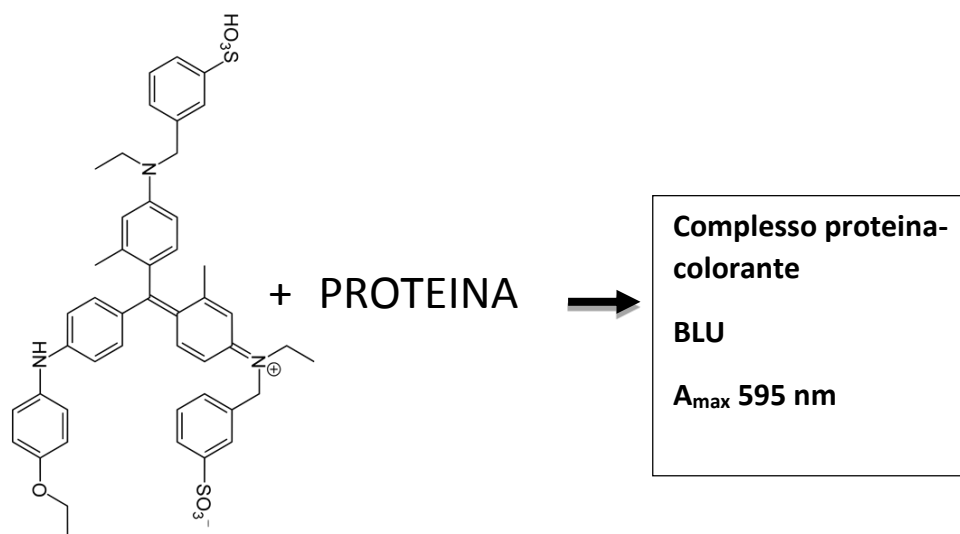


Fig.9: Reazione schematica tra Blu di Coomassie e proteina

BCA

Il BCA è un kit per l'individuazione colorimetrica e la quantificazione delle proteine totali. Questo metodo si basa sulla riduzione di Cu^{2+} a Cu^+ ad opera delle proteine in condizioni alcaline, con individuazione colorimetrica altamente sensibile e selettiva del catione Cu^+ usando un reagente che contiene acido biconcinnico. La reazione tra BCA e Cu^+ porta allo sviluppo di un intenso colore viola con un massimo di assorbanza a 562 nm (Smith, 1985). Questa colorazione è dovuta alla chelazione di due molecole di BCA con uno ione Cu^+ (Fig.10). L'assorbanza a 562 nm presenta un andamento quasi lineare con l'aumentare della concentrazione di proteina per un ampio intervallo di lavoro (20-2000 $\mu\text{g/mL}$). Questo metodo non ha un vero e proprio punto finale, il colore continua a cambiare ma questo cambiamento è sufficientemente lento da permettere l'analisi contemporanea di un largo numero di campioni.

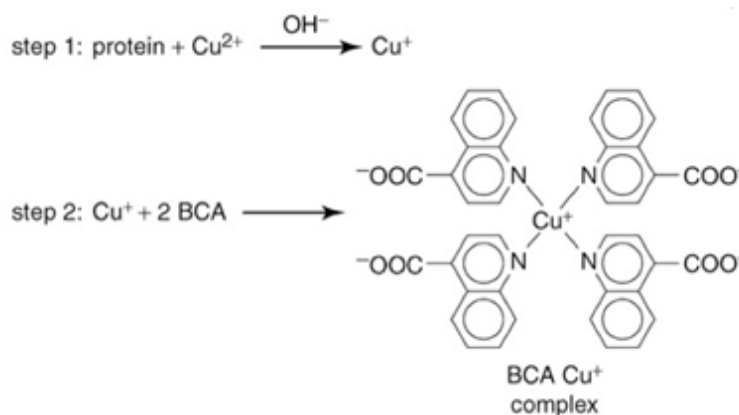


Fig.10: Reazione schematica tra BCA e proteina

Il colore formato con il BCA è legato alla struttura macromolecolare della proteina, al numero di legami peptidici e alla presenza di quattro particolari amminoacidi (cisteina, cistina, triptofano e tirosina). Siccome la produzione di Cu^+ in questo esame è funzione della concentrazione delle proteine in soluzione e del tempo d'incubazione, la quantificazione di proteine in campioni sconosciuti può essere determinata spettrofotometricamente tramite confronto con proteine standard a concentrazione nota (Wiechelman, 1988). Il metodo colorimetrico a base di BCA è utile per la determinazione quantitativa di proteine grazie alla sua elevata sensibilità, facilità e tolleranza ai vari contaminanti presenti in campioni biologici o aggiunti durante la purificazione del campione. Tuttavia altre sostanze, sia naturalmente presenti nel campione sia aggiunte, interferiscono con la metodica del BCA. Si deve infatti considerare che, poiché il metodo coinvolge la riduzione di Cu^{2+} a Cu^+ ad opera delle proteine, composti riducenti (come DTT, cisteina o zuccheri riducenti) o reagenti chelanti il rame (come EDTA) possono causare interferenze. Altre sostanze che possono interferire sono: acido ascorbico, catecolamina, creatinina, cisteina, EGTA, glicerolo impuro, perossido di idrogeno, idrazide, ferro, lipidi, melibiosio, rosso fenolo, saccarosio impuro, triptofano, tirosina, acido urico (Pierce). La procedura richiede un rapporto proteina/reagente di 1:20 (v/v). Il reagente corrisponde ad una miscela di un reagente A e un reagente B in un rapporto 50:1 (v/v) dove il reagente A è costituito da carbonato di sodio, bicarbonato di sodio, acido bicinconinico e tartrato di sodio in idrossido di sodio 0.1 M mentre il reagente B è costituito da solfato di rame al 4%. Dopo aver aggiunto il reagente al campione, si lascia ad incubare a 37°C per 30 minuti. Una volta raffreddate le soluzioni vengono analizzate leggendo l'assorbanza a 562 nm (Fig.11).



Fig.11: procedura di analisi con il kit BCA

2.11 Saggi di attività antimicrobica

L'attività antimicrobica dei peptidi è stata analizzata utilizzando diversi ceppi batteri: *Pseudomonas aeruginosa*, ceppo *wild-type* di PAO1 di (ceppo H103), *Escherichia coli* ceppo DH5 α , *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e ceppi clinici di *Pseudomonas aeruginosa* isolati da pazienti fibrosi cistica e gentilmente fornito dal Dr. Alessandra Bragonzi (Ospedale San Raffaele , Milano , Italia) . Per misurare la MIC dei peptidi è stato utilizzato il metodo delle microdiluizioni in terreno (34) con piccole modifiche. Il test è stato eseguito in Difco Nutrient Broth (Becton - Dickenson, Franklin Lakes, NJ) utilizzando un inoculo batterico di $\sim 5 \times 10^5$ CFU / ml per pozzetto. Tasso di mortalità è stato misurato secondo Pizzo et al 2011 [35]. Tutti i composti sono stati testati in triplicato e le deviazioni standard erano sempre < 5 % per ogni esperimento.

2.12 Saggio di proliferazione cellulare MTT

Sono state analizzati i comportamenti di varie linee cellulari eucariotiche (HaCat, THP-1 indifferenziate, THP-1 differenziate, HeLa, CaCo-2 e HEK) in presenza di rApoE_{PM}(133-150) o di ApoE_{PM}(133-167). Su una piastra da 96 pozzetti sono stati distribuite per ogni pozzetto un numero noto di cellule in presenza del peptide da testare a tre diverse concentrazioni (esprese come $\mu\text{g/ml}$). Per ottenere delle statistiche attendibili ogni campione è stato analizzato in triplicato. Inoltre si è deciso di allestire una sospensione cellulare di controllo per verificare che l'eventuale mortalità cellulare non fosse dovuta allo stato iniziale delle cellule o alla composizione del tampone nel quale era risospesa la proteina. La piastra è stata poi lasciata in incubazione a 37°C per vari intervalli di tempo (24h, 48h, 72h) e in presenza di CO₂ al 5%.

Al termine dell'incubazione è stato aspirato da ogni pozzetto il mezzo di coltura ed è stato aggiunto l'MTT [3-(4-5 dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolo bromuro], un reattivo colorato suscettibile delle deidrogenasi mitocondriali. Questa analisi si basa infatti su un test quantitativo di tipo colorimetrico che permette la rilevazione della proliferazione cellulare in vitro. Le cellule vive infatti sono in grado di ridurre MTT, per azione della succinato deidrogenasi mitocondriale, in un prodotto di colore blu intenso (formazano). Il test rappresenta quindi una espressione della vitalità cellulare e al tempo stesso un test di tossicità. Dopo un'incubazione al buio e il dissolvimento dei cristalli di formazano in seguito all'aggiunta di isopropanolo acido 0,1M è stata valutata la proliferazione cellulare attraverso uno spettrofotometro (VICTOR Perkin Elmer Precisely) alla lunghezza d'onda di 570nm. I valori di assorbanza ricavati sono direttamente proporzionali alla vitalità cellulare in ciascun pozzetto.

2.13 Dicroismo Circolare

Gli spettri di dicroismo circolare (CD) sui peptidi rApoEPM (133-150), rApoEPM (133-167) o r(P) GKY-20 sono stati registrati con un J-810 spettropolarimetro dotato di un sistema di controllo di temperatura Peltier (Modello PtC- 423-S, Jasco Europe, Cremella, LC, Italia). Le misure nell'intervallo 197-260 (lontano-UV) sono state effettuate in 20 ° C utilizzando una cella con lunghezza del cammino ottico di 0,1 cm e una concentrazione di peptide pari a 50 µM. Gli spettri sono stati registrati con una costante di tempo di 4 s, una larghezza di banda 2 nm, e una velocità di scansione di 10 nm min⁻¹. La linea di base è stato corretta sottraendo lo spettro del tampone. Gli spettri CD in presenza di LPS da *Pseudomonas aeruginosa* ceppo 10 (Sigma Aldrich, purificato mediante estrazione con fenolo) o alginato (Sigma Aldrich) sono stati registrati utilizzando diverse concentrazioni di ciascun composto (da 0,2 a 1,6 mg / ml) e la linea di base è stato corretta sottraendo lo spettro ottenuti da LPS e alginato in assenza di peptide. Ulteriori spettri CD sono stati acquisiti in presenza di diverse concentrazioni di SDS o trifluoroetanolo (TFE). L'analisi del contenuto di struttura secondaria era eseguito con software CDPro.

2.14 Saggio di Emolisi

Il saggio di emolisi è stato utilizzato al fine di verificare l'eventuale effetto tossico del peptide sulle cellule del sangue.

Per l'esperimento sono state utilizzate concentrazioni di peptide crescenti da 0 a 40 µM. Come controllo positivo è stato utilizzato il Triton X-100 allo 0,2%, che è in grado di lisare il 100% delle cellule utilizzate. Come controllo negativo è stato utilizzato il terreno *RPMI*.

Per ogni concentrazione sono stati utilizzati 2,25 x10⁸ di eritrociti di ratto, una volta somministrato il peptide alle cellule si è atteso un periodo di incubazione, a 37°C, pari ad 1 ora. Al termine del periodo di incubazione si è valutata la liberazione di emoglobina attraverso letture spettrofotometriche a 450 nm. Il livello di emoglobina liberata in seguito a lisi degli eritrociti, è stato valutato confrontando l'assorbanza di ogni punto analizzato con l'assorbanza del trattamento con Triton x-100 allo 0,2%.

2.15 qRT-PCR

La *qRT-PCR* è una tecnica che permette di amplificare e simultaneamente quantizzare il DNA tramite l'utilizzo di intercalanti del doppio filamento.

La fase di retro-trascrizione precede la fase di *PCR* in *realtime* e fa sì che l'RNA venga retro-trascritto in cDNA, mantenendo inalterati i rapporti relativi di concentrazione dei diversi RNA. In questo modo è possibile misurare l'espressione relativa di un gene o più geni in condizioni differenti.

Per questo esperimento si è deciso di monitorare i livelli di espressione delle citochine IL-8 e COX-2 coinvolte (come noto in letteratura) nel processo infiammatorio indotta da PAMPs, come l'LPS. In ogni pozzetto di una multiwells da 6 pozzetti sono state piastrate 80000 cellule HaCat (cheratinociti umani immortalizzati vedi paragrafo 2.24 per una breve descrizione).

Dopo aver atteso 24 ore affinché esse aderissero alla base del pozzetto, le cellule sono state trattate con LPS da *E. coli* ceppo 0111:B4 (*Sigma Aldrich*) ad una concentrazione di 50 ng/μl per un'ora. Al termine di questa incubazione, i pozzetti sono stati lavati con PBS pH 7.4 per due volte, dopo di che è stato somministrato terreno di coltura fresco contenente il peptide ad una concentrazione di 3 μM e 9 μM e si è incubato a 37°C per un'ora. Al termine dell'incubazione le cellule sono state staccate e trattate con il TRI-Reagent (*Sigma-Aldrich*) secondo le specifiche indicate dal produttore al fine di estrarre l'RNA totale. L'RNA totale estratto è stato quantizzato e visualizzato su gel di agarosio al fine di controllarne la qualità. L' RNA totale è stato convertito usando il Thermoscript *RT-PCR* (Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore.

Un milligrammo di RNA totale è stato convertito in cDNA trattandolo con 200 unità di trascrittasi inversa e 500 ng di oligo (dT) primer in Tris-HCl 50 mM pH 8.3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3mM, ditiotreitolo 10 mM e deossinucleotidi trifosfati 1 mM a 42°C per 1 ora.

La reazione è stata fermata mediante riscaldamento a 70 °C per 15 minuti e la miscela è stata utilizzata per la reazione di amplificazione.

A questo punto il cDNA è stato quantizzato e controllato su gel di agarosio e si è proceduto allo step successivo ossia l'amplificazione tramite PCR utilizzando i primer specifici per COX-2 e IL-8. La PCR è stata effettuata utilizzando KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.3, MgCl₂ 1.5 mM, deossinucleotidi trifosfati 0.2 mM, 2.5 unità di DNA polimerasi Taq e 0.1 mM dei primers di IL-8 e COX2. Al fine di valutare la quantità di DNA a doppio filamento presente dopo ogni ciclo di sintesi, nella miscela di reazione è presente il SYBR Green (nelle condizioni indicate dalla casa produttrice), un composto fluorescente intercalante del DNA. La fluorescenza del SYBR Green aumenta considerevolmente nel momento in cui la molecola si intercala nel DNA a doppio filamento, pertanto, la misura quantitativa della fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità di DNA a doppio filamento presente in ogni campione (che è, a sua volta, proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione iniziale). La lettura della fluorescenza avviene al termine di ogni ciclo di amplificazione.

2.16 Saggio ELISA

Il saggio ELISA è stato effettuato con il kit acquistato presso la *R&D SystemsTM* specifico per la rilevazione dei livelli di IL-6. Il saggio ha previsto una fase preliminare durante la quale si prepara la piastra a ricevere il campione. Si diluisce il "*Capture Antibody*" all'opportuna concentrazione con PBS sterile, 100 µl di anticorpo diluito sono aggiunti in ogni piastra e vengono incubati per una notte a temperatura ambiente.

Dopo una notte l'anticorpo viene aspirato e vengono effettuati dei lavaggi con 400 µl di "*Wash Buffer*", la rimozione completa del wash è necessaria affinché si abbia una ottima resa finale. Le piastre vengono bloccate con 300 µl di "*Reagent Diluent*" per pozzetto e incubate per un'ora a temperatura ambiente. Vengono effettuati due lavaggi come descritto precedentemente, a questo punto le piastre sono pronte per essere utilizzate. A questo punto possiamo aggiungere 100 µl di campione in ogni pozzetto, la multiwells viene incubata per due ore a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione vengono effettuati due lavaggi con il "*Wash Buffer*", al termine dei quali per ogni pozzetto sono piastrati 100 µl di "*Detection Antibody*", diluito in "*Reagent Diluent*" e si incuba il tutto per due ore a temperatura ambiente.

Vengono effettuati due lavaggi con il Wash Buffer, dopo di che si aggiungono 100 µl di *Streptavidina-HRP*" (fornita dal kit alla diluizione di utilizzo), e si incuba il tutto per 20 minuti a temperatura ambiente e al buio.

Vengono ripetuti i due lavaggi e aggiunti 100 µl di "*Substrate Solution*" per ogni pozzetto e il tutto è incubato per 20 minuti a temperatura ambiente al buio. Al termine dell'incubazione vengono aggiunti 50 µl di "*Stop Solution*" per ogni pozzetto e viene immediatamente rilevata l'assorbanza a 450 nm.

2.17 Saggio di Griess

Il saggio di Griess è un saggio colorimetrico che permette di valutare la presenza di ossido nitrico all'interno di una soluzione. La reazione di Griess è una reazione chimica usata per rilevare la presenza di nitriti e misurarne la concentrazione per via spettrofotometrica.

La reazione viene condotta utilizzando il reattivo di Griess, formato da una miscela di acido solfanilico e 1-naftilammina, in soluzione acida. In queste condizioni il nitrito tende a formare acido nitroso (HNO_2), il quale reagendo con l'acido solfanilico produce un sale di diazonio (diazotazione). Il sale di diazonio, a sua volta, dà una reazione di copulazione con la 1-naftilammina originando un colorante azoico di colorazione rossa che presenta un picco massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 550 nm.

Questo saggio è stato effettuato al fine di verificare la produzione di ossido nitrico da parte delle cellule Raw (monociti di ratto) in seguito ad infiammazione con LPS. L'ossido nitrico è prodotto da NO sintetasi espresse e attivate durante il processo infiammatorio.

Per il saggio sono state depositate in ogni pozzetto di una *multiwells* da 96 50000 cellule e sono state attese 24 ore. Al termine delle quali è stato somministrato l'LPS ad una concentrazione di 20 ng/ml, il peptide è stato testato a due concentrazioni differenti: 5 e 20 μM . Come controllo negativo è stato utilizzato solo il terreno; le *multiwells* così allestite sono state incubate a 37°C per 24 ore. L'LPS utilizzato in questo saggio è l'LPS di *Salmonella enterica* acquistato presso la *Sigma-Aldrich*.

Al termine dell'incubazione sono stati prelevati 50 μL di terreno ai quali sono stati aggiunti 50 μL di reattivo di Griess (*Sigma-Aldrich*). Dopo una breve incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente in agitazione, è stata letta l'assorbanza a 550 nm. Come riferimento è stato utilizzato la concentrazione di ossido nitrico relativa al controllo negativo.



CAPITOLO 3: RISULTATI



3.1 Clonaggio della proteina chimerica **ONC-His-DPM-ApoE (133-150)** e **ONC-His-DPM-ApoE (133-167)**

La sintesi chimica dei peptidi è generalmente caratterizzata da elevati costi di produzione e talvolta da vincoli esecutivi legati alle caratteristiche intrinseche delle molecole prese in esame (sequenza, lunghezza ecc.). La prima parte del mio progetto di dottorato ha riguardato la messa a punto di una innovativa procedura di produzione in forma ricombinante di peptidi in cellule di *E.coli*.

La diretta espressione di AMPs in ospiti come batteri risulta essere molto complessa a causa della tossicità degli stessi peptidi; a tal riguardo si è pensato a una strategia di produzione che prevedesse l'espressione di proteine di fusione *carrier-peptide*. Il *carrier* nel sistema di fusione ha lo scopo di proteggere e quindi mascherare il peptide da tagli proteolitici (aumentandone la stabilità) e limitandone al contempo la sua tossicità.

Il *carrier* di fusione scelto per l'espressione della proteina di fusione è una ribonucleasi identificata in *Rana pipiens*, conosciuta come onconasi. L'onconasi è stata scelta come *carrier* perché in forma ricombinante è capace di formare corpi di inclusione, cioè grossi aggregati proteici ed insolubili. Nella proteina di fusione questa caratteristica consentirebbe di mascherare il peptide preservandolo dalle proteasi batteriche e di inattivarne il potenziale tossico. Infine, essendo i corpi di inclusione degli aggregati proteici relativamente omogenei, rappresentano un'ottima strategia per la purificazione del peptide.

Al fine di separare il *carrier* di fusione dal peptide di interesse, in fase di clonaggio è stata aggiunta una sequenza *linker* tra la sequenza codificante per l'onconasi e quella codificante per il peptide. Tale *linker* codifica per la sequenza amminoacidica DPM (aspartato-prolina-metionina) in cui residui DP rappresentano il sito di idrolisi acido labile mentre il residuo di metionina è presente per un eventuale taglio chimico con bromuro di cianogeno (non trattato in questo elaborato di tesi). La sequenza *linker* così configurata consente di poter agevolare la separazione del *carrier* dal peptide di interesse (che in caso di taglio acido porterà con sé il residuo di prolina e metionina all'N-terminale).

Va inoltre sottolineato che, al fine di evitare che durante l'idrolisi acida non venissero prodotti frammenti peptidici dovuti alla degradazione di regioni esterne al *linker*, la sequenza codificante l'onconasi è stata modificata in modo da sostituire tutti i codoni codificanti l'acido aspartico, in quanto esperimenti pregressi avevano permesso di constatare che in condizioni acide anche i dipeptidi DC presentavano una certa suscettibilità all'autoidrolisi. Questa mutagenesi ha prodotto una variante, definita *ONC-DC-less* codificante per un

prodotto avente carica netta, idrofobicità e strutture secondarie analoghe a quelle della proteina *wild type*.

Per poter agevolmente purificare la proteina ricombinante da tutte le altre proteine endogene di *E. coli* eventualmente inglobate nei corpi di inclusione, si è scelto di aggiungere al costrutto una sequenza codificante per un *His-tag*. Questa sequenza, posta a monte della sequenza *linker*, permette la purificazione del prodotto proteico mediante una cromatografia di affinità con ioni metallici immobilizzati su resina IMAC: tali ioni possono specificamente e reversibilmente essere chelati dagli anelli imidazolici istidinici, trattenendo la proteina e facilitandone la purificazione.

Resta infine da sottolineare che la sequenza genica codificante per il peptide di interesse, nel nostro caso quella codificante per ApoE (133-150) o per ApoE (133-167), è stata costruita in modo tale da avere nelle regioni fiancheggianti i siti di restrizione Bam-H1 e Sac1 così da poter essere agevolmente eseguito il clonaggio (Fig.12).

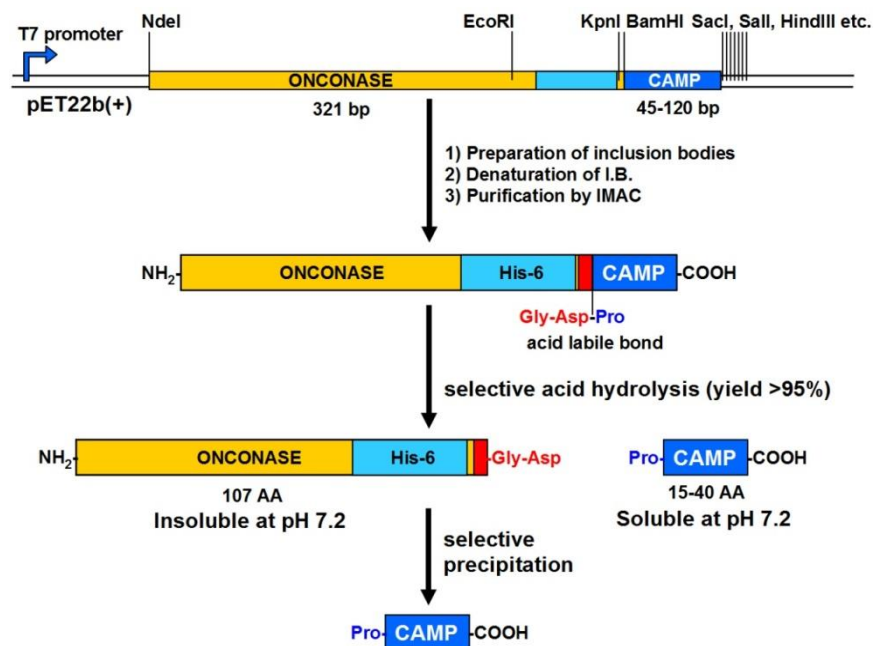


Fig.12: Rappresentazione schematica del sistema di clonaggio e purificazione

Il clonaggio e l'espressione della sequenza genica codificante per le proteine di fusione, ONC-DCless-His-DPM-ApoE (130-155) e ONC-DCless-His-DPM-ApoE (133-167) ha richiesto diverse tappe sperimentali: innanzitutto l'utilizzo di due vettori Pex-A2 e pET22b(+). La sequenza codificante il peptide è stata prodotta attraverso sintesi chimica e inserita all'interno del vettore Pex-A2 dalla *Eurofins MWG Operon*. Da essa è stato estratto l'inserto attraverso digestione enzimatica. Tale inserto è stato sottoposto a ligasi nel vettore di

espressione, già contenente la sequenza ONC-DC-less-HIS-DPM, precedentemente digerito con gli stessi enzimi. Si tratta di un vettore appartenente alla serie pET e specifico per l'espressione ad alte rese in *E. coli*. Tale vettore presenta diverse caratteristiche peculiari: la sequenza da esprimere è posta sotto il controllo di un promotore specifico per la RNA polimerasi del fago T7 si tratta di un enzima estremamente attivo e specifico, capace di portare l'espressione del peptide di interesse a livelli molto elevati.

Si è poi proceduto alla trasformazione di un ceppo batterico (*E. coli top10*) con la miscela di ligasi al fine di propagare il costrutto. Il DNA plasmidico contenuto nelle colonie ricombinanti è stato analizzato per la presenza dell'inserto attraverso PCR con i *primer* presenti a monte e a valle del sito del *polylinker*, T7 e T7-ter, seguita da analisi elettroforetica e infine sequenziato. I plasmidi contenenti l'inserto sono stati poi purificati e utilizzati per trasformare un secondo ceppo batterico *E. coli BL21(DE3)* utile ai fini dell'espressione della proteina di fusione.

3.2 Espressione delle proteine chimeriche ONC-His-DPM-ApoE (133-150) e ONC-His-DPM-ApoE (133-167)

L'espressione della proteine di fusione ONC-DCless-His-DPM-ApoE (133-150) e ONC-DCless-His-DPM-ApoE (133-167) in cellule di *E.coli* ceppo BL21 (DE3) è stata condotta come descritto in Materiali e Metodi. I corpi di inclusione sono stati raccolti e purificati mediante cromatografia di affinità su Ni Sepharose [™] (GE Healthcare). Le frazioni di eluizione sono state riunite e sottoposte ad analisi elettroforetica su gel al 15% di SDS-PAGE. Dopo aver analizzato le frazioni, quest'ultime sono state dializzate contro acido acetico 0.1 M pH 3. Il materiale insolubile è stato rimosso per centrifugazione e filtrazione. La soluzione contenente il costrutto di fusione è stato quindi acidificato a pH 2 con HCl 0.5 M; il taglio del peptide dalla sequenza *linker* e dalla proteina *carrier* è stata indotta incubando la soluzione a 60°C per 24 ore. In letteratura è noto che a pH neutro o acido l'onconasi è insolubile, per questo motivo dopo il taglio si è proceduto ad una precipitazione selettiva del *carrier* riportando il pH intorno a 7-7,2 con l'aggiunta di 1 M di NH₃ e incubando a 28°C per la notte. Il peptide rilasciato è stato isolato dai componenti insolubili attraverso ripetuti cicli di centrifugazione e infine liofilizzato. La purezza dei peptidi, da questo momento definiti rApoE_{PM} (133-150) e rApoE_{PM} (133-167), è stata controllata mediante SDS-PAGE mentre tramite spettrometria di massa, gentilmente eseguita dal Dr. Antimo Di Maro, Seconda Università di Napoli, ne è stato validato il peso molecolare.

Lo studio di rApoE_{PM} (133-150) e rApoE_{PM} (133-167) è stato condotto usando come controllo positivo un peptide già noto in letteratura, GK20, corrispondente ai residui 231-250 della catena pesante della trombina umana.

GKY20 è stato prodotto in forma ricombinate e purificato nelle stesse modalità con cui è stato purificato rApoE PM (133-150). L'unica differenza tra i due peptidi è che rGKY20 presenta come residuo aggiuntivo all'estremità N-terminale solo la prolina - r(P)GKY20, mentre i peptidi di questo elaborato di tesi contengono oltre alla prolina anche la metionina in quanto, come menzionato in precedenza, nella strategia di clonaggio del prodotto di fusione era stato previsto anche il sito di idrolisi chimica mediante bromuro di cianogeno. Anche per rGKY20 è stato eseguito uno spettro di massa che ha confermato per il peptide purificato le dimensioni molecolari attese. La descrizione completa della preparazione di r (P)GKY20 è riportato altrove [32].

3.3 Attività antimicrobiaca di rApoE PM (133-150)

L'attività antibatterica di rApoE PM (133-150) è stata studiata confrontandola con quella di r(P)GKY20. Le analisi delle MIC condotte con il metodo CLSI (*Clinical & Laboratory standard Method Institute*) hanno evidenziato valori di MIC per rApoE PM (133-150) di 1.5, 6 e 7,5 µM rispettivamente nei confronti di *E. coli* ceppo DH5α, *S. aureus* ATCC 6538P e *P. aeruginosa* KK27. E' interessante notare che i valori di MIC per r(P)GKY20 ricavati nei confronti degli stessi ceppi batterici sono risultati in due casi leggermente superiori mentre per *P.aeruginosa* addirittura non determinabili (Tabella 2).

Bacterial strains	Peptide	MIC [µM]
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	rApoE PM(133-150)	1.5
	r(P)GKY-20	6
<i>E. coli</i> DH5α	rApoE PM(133-150)	6
	r(P)GKY-20	12
<i>P. aeruginosa</i> KK27	rApoE PM(133-150)	7.5
	r(P)GKY-20	n. d.

Tabella 2: Valori di MIC di rApoE PM (133-150) e r(P) GKY - 20 su ceppi di *S. aureus* ATCC 6538P, *E.coli* DH5α e *P. aeruginosa* KK27.

E' stato condotto inoltre lo studio del tasso di mortalità, causato da entrambi i peptidi, nei confronti di di *S. aureus* ATCC 6538P e del ceppo clinico *P. aeruginosa* KK27. I risultati, illustrati in figura 13, hanno confermato una maggiore azione battericida da parte di rApoE_{PM} (133-150) rispetto a quella misurata per r(P)GKY20. L'attività antibatterica di rApoE_{PM} (133-150) è stata misurata anche su altri due ceppi *P. aeruginosa* e su *Escherichia coli* (DH5α) e in tutti i casi è stata riscontrato un effetto dose dipendente (dati non mostrati)

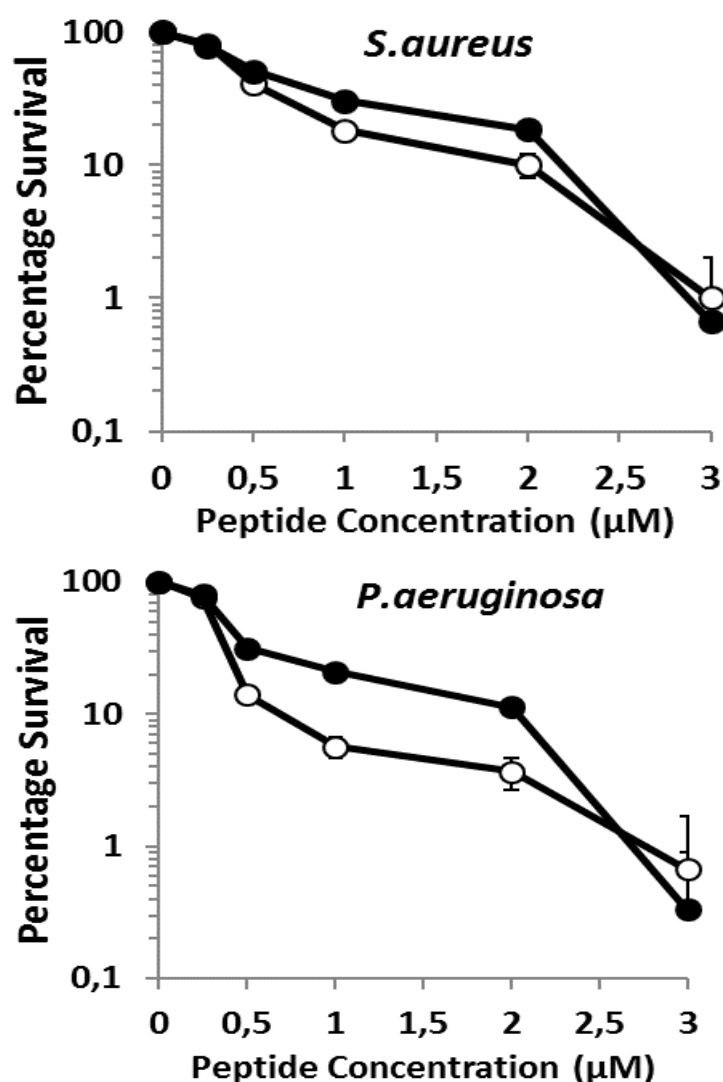


Fig.13: Attività antibatterica del peptide ricombinante ApoE_{PM} (133-150) (cerchi bianchi) rispetto a quella di r(P)GKY20 (cerchi neri). (A) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. (B) *Pseudomonas aeruginosa* KK27. L'errore relativo è sempre inferiore al 10 % della misura.

Come descritto in precedenza, il peptide ricombinante rApoE_{PM} (133-150) possiede all'estremità N-terminale due amminoacidi addizionali (Pro e Met), rispetto alla sequenza amminoacidica 133-150 identificata nella proteina ApoE. Al fine di verificare che l'azione battericida del peptide ricombinante non fosse influenzata dalla presenza di questi residui addizionali, si è pensato di allestire un esperimento su cellule di *E.coli* DH5 α (Fig. 14) nel quale l'azione battericida di rApoE_{PM} (133-150) era confrontata con quella del peptide sintetico ApoE (133-150), da questo momento in poi identificato come sApoE (133-150). I risultati ottenuti da tale analisi hanno messo in evidenza un'azione citotossica dei due peptidi molto simile, avvalorando l'ipotesi che la presenza dei due residui addizionali di rApoEPM (133-150) non sono determinanti per l'attività antimicrobica di quest'ultimo (Fig.14).

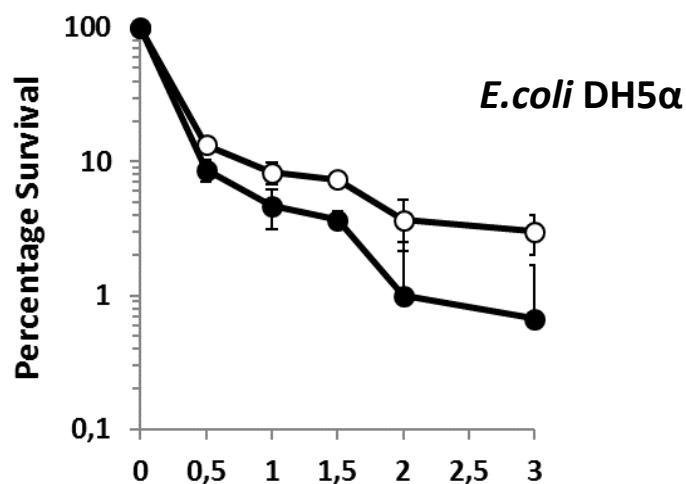


Fig.14: Attività antibatterica del peptide ricombinante ApoE_{PM} (133-150) (cerchi bianchi) rispetto a quella del peptide sintetico ApoE (133-150) (cerchi neri). L'errore relativo è sempre inferiore al 10 % della misura.

3.4 Attività antimicrobica di rApoE_{PM} (133-167)

Una volta purificato all'omogeneità, ApoE(133-167) è stato sottoposto a una caratterizzazione della sua attività citotossica. Il primo obiettivo posto è stato quello di individuare la *Minimal inhibitory concentration* (MIC) su diversi ceppi batterici.

L'analisi dell'attività antibatterica di ApoE(133-167) è stata effettuata su *Escherichia coli* ceppo DH5 α , *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P e *Pseudomonas aeruginosa* ceppo P14, quest'ultimo isolato da pazienti affetti da Fibrosi Cistica. I ceppi sopradescritti sono stati fatti crescere in agitazione in terreno liquido *Nutrient Broth*, come descritto in materiali e metodi, e successivamente piastrati in una *multiwells* da 96 pozzetti per testare concentrazioni diverse di peptide al fine di individuare la MIC.

Bacterial strain	MIC (μ M)		
	GKY20	ApoE(133-150)	Apo E(133-167)
E. coli DH5 α	12.5	12.5	12.5
P. aeruginosa PA14	50	50	25
S. aureus ATCC 6538P	6.25	3.12	6.25
E. coli DH5 α	12.5	12.5	12.5

Tabella 3: Confronto delle attività antibatteriche di Apo E(133-167), Apo E(133-150) e GK Y20. I valori di MIC mostrati sono stati ricavati da tre esperimenti indipendenti.

I dati mostrati in tabella evidenziano che il peptide ApoE(133-167) possiede una attività antibatterica del tutto confrontabile a quella dei due peptidi utilizzati come controllo positivo.

3.5 Caratterizzazione strutturale di rApoE_{PM}(133-150) mediante dicroismo circolare

Le analisi degli spettri dicroici (CD) indicano che rApoE_{PM}(133-150) non è strutturato in PBS ma acquisisce la capacità di ripiegarsi solo in presenza di agenti che mimano il comportamento delle membrane batteriche, come ad esempio TFE e SDS (Fig. 15 A - B), quindi perfettamente in linea con quello che caratterizza molti altri AMPs [55;56].

Come è possibile osservare negli spettri CD in figura, a concentrazioni crescenti di TFE e SDS, diventano sempre più evidenti due minimi, rispettivamente uno a 208 e l'altro a 222 nm, e un massimo a una lunghezza inferiore a 200 nm; tali valori suggeriscono la capacità da parte di rApoE_{PM}(133-150) di assumere una conformazione ad α - elica. A tal riguardo va sottolineato che anche il peptide controllo r(P) GKY20, sottoposto alla stessa procedura, ha mostrato caratteristiche strutturali simili a quelle di rApoE_{PM}(133-150) (Fig. 15C - D).

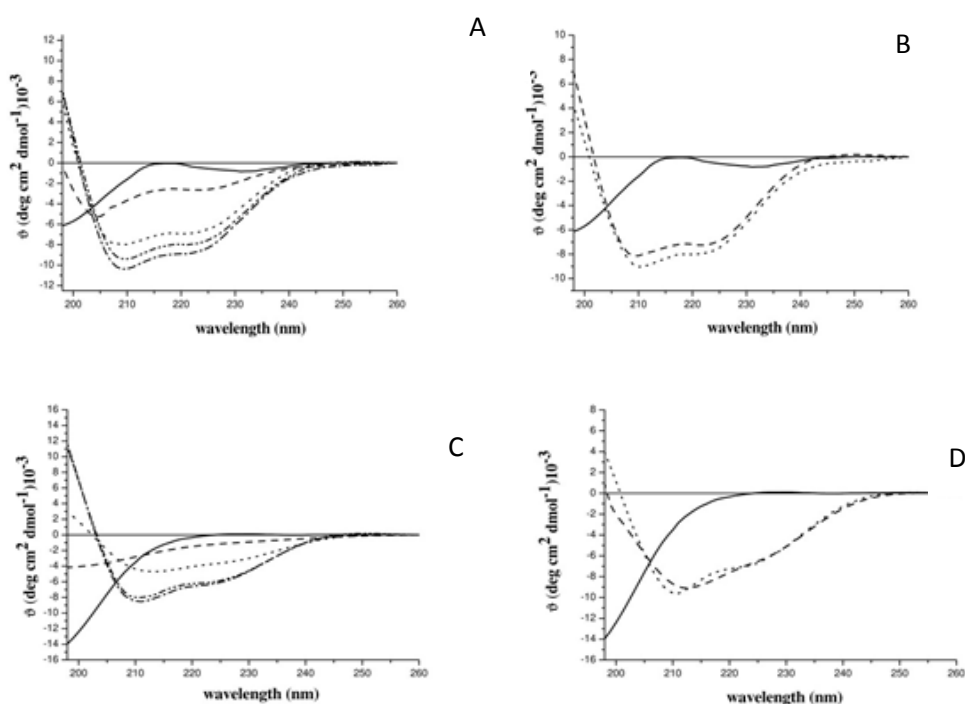


Fig.15: Spettri CD dei peptidi ricombinanti in presenza di agenti che mimano membrane (TFE o SDS). rApoEPM (133-150) spettri in presenza di diverse concentrazioni di TFE (A) o SDS (B). r(P)GKY - 20 spettri in presenza di diverse concentrazioni di TFE (C) o SDS (D). I pannelli (A) e (C): peptide in PBS linea continua) o 10 % TFE (---); 20 % (····); 40 % (- · - · -); 50 % (- · · · -). I pannelli (B) e (D): peptide in PBS (linea continua) o SDS 10mM (---); SDS 20 mM(····).

E' inoltre interessante sottolineare che la conformazione ad α -elica è stata osservata a una concentrazione di TFE 40 %, (Fig.16), indicando così una elevata propensione per rApoE PM (133-150) ad acquisire una conformazione ordinata

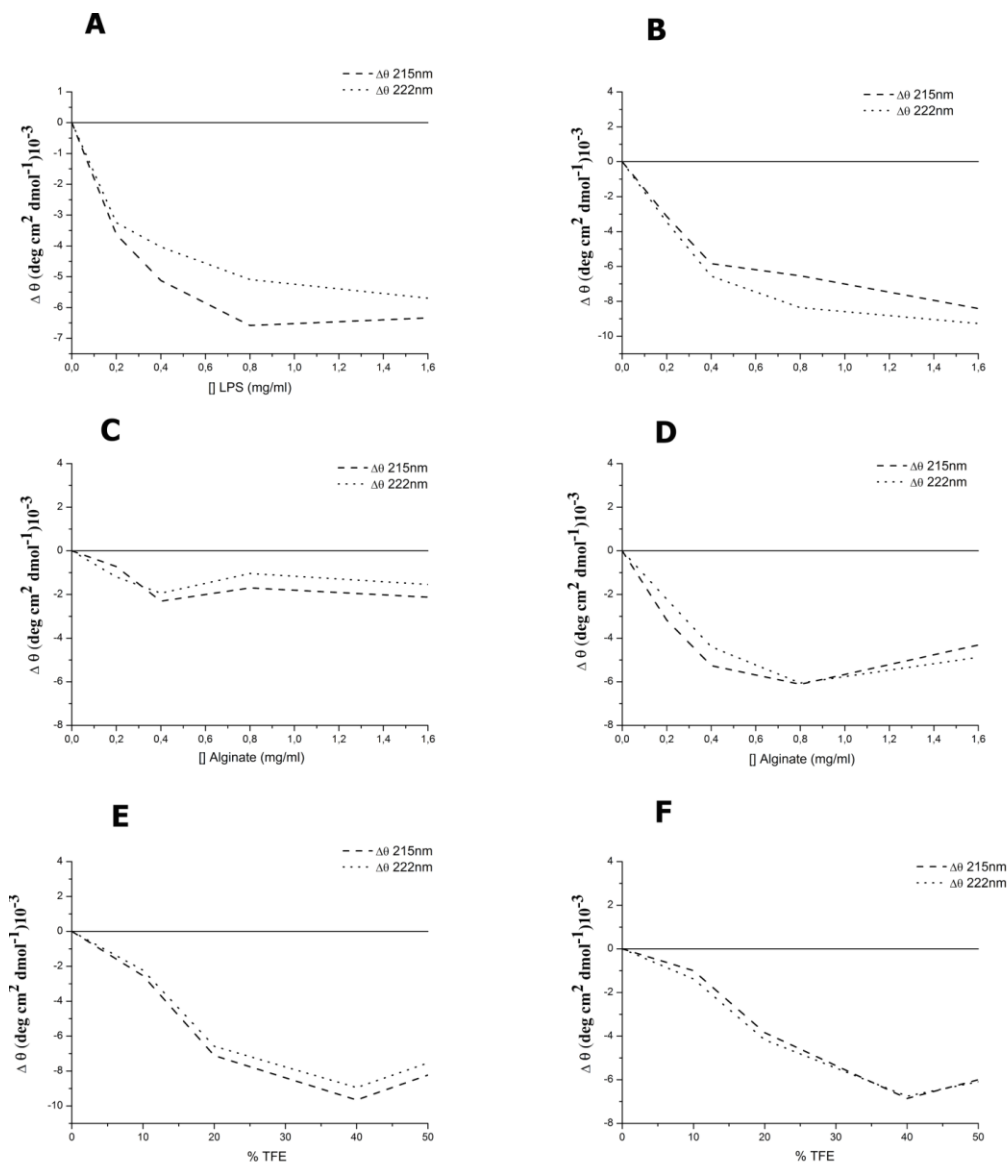


Fig.16: $\Delta\theta$ a lunghezza d'onda differente dei peptidi ricombinanti in presenza di diversi additivi. I $\Delta\theta$ stati ottenuti sottraendo i valori θ di peptidi in presenza di diverse concentrazioni di additivi ai valori θ di peptidi in PBS pH 7,4. $\Delta\theta$ di rApoEPM (133-150) in presenza di diverse concentrazioni di LPS da *P. aeruginosa* (A) , alginato (C) o TFE (E) . $\Delta\theta$ di r(P)GKY20 in presenza di diverse concentrazioni di LPS da *P. aeruginosa* (B) , alginato (D) o TFE (F) .

Al fine di caratterizzare ulteriormente le proprietà strutturali di rApoE_{PM} (133-150), sono state eseguite analisi mediante spettroscopia CD anche in presenza di LPS (Fig. 17A), il componente principale della membrana esterna dei batteri Gram negativi.

Quando rApoE_{PM} (133-150) è stata analizzata in presenza di concentrazioni crescenti di LPS (0,2 mg/ml a 1,6 mg/ml) purificati da *P. aeruginosa* (Fig. 17A) o da *E. coli* ceppo 0111: B4, due minimi erano evidenti intorno ai valori 208 e 222 nm, suggerendo che il peptide adotta una conformazione elicoidale anche in presenza di LPS. Anche in questo caso, risultati simili in presenza di LPS sono stati ottenuti per il peptide controllo r(P)GKY20, come mostrato in Fig. 17B.

E' noto che l'alginato, un esopolisaccaride abbondante nel biofilm di diversi ceppi batterici, interagisce con alcuni AMPs inducendone l'acquisizione di una conformazione ad α -elica [57]. Pertanto, si è pensato di analizzare il comportamento di rApoE_{PM} (133-150) e r(P)GKY20 in presenza di concentrazioni crescenti di alginato (da 0,2 mg/ml a 1,6 mg / ml). Gli spettri registrati in presenza di alginato di entrambi i peptidi (Fig. 17 C e D) hanno rilevato la presenza di forme molto differenti da quelle osservate in presenza di TFE, SDS e LPS. Gli spettri ottenuti per r(P)GKY20 titolando ad alte concentrazioni di alginato erano infatti caratterizzati da un unico minimo rilevabile tra 215 e 220 nm, suggerendo così una conformazione estesa. Al contrario gli spettri ottenuti nel caso di rApoE_{PM} (133-150) erano piuttosto complessi e di difficili interpretazione. Per tale motivo, al momento, non si è in grado di determinare se rApoE_{PM} (133-150) è capace di interagisce con l'alginato e quale tipo di struttura può adottare.

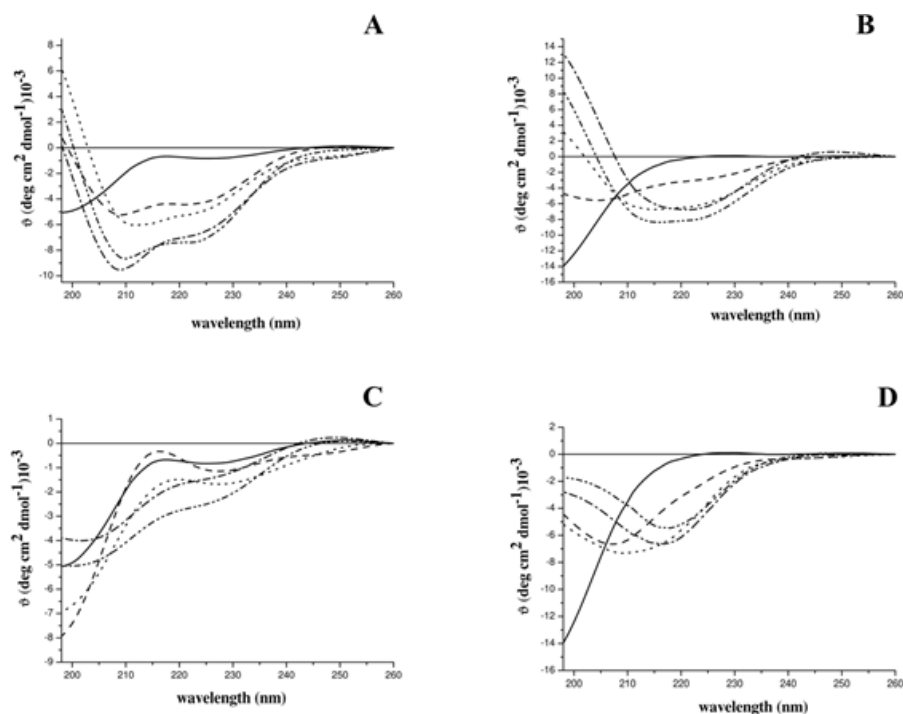


Fig.17: Spettri CD dei peptidi ricombinanti in presenza di diverse concentrazioni di LPS. rApoE_{PM} (133-150) in presenza di diverse concentrazioni di LPS da *P. aeruginosa* (A) o alginato (C). r(P)GKY20 in presenza di diverse concentrazioni di LPS da *P. aeruginosa* (B) o alginato (D). Peptide da solo (linea continua); in presenza di 0,2 mg/ml LPS (-); 0,4 mg/ml di LPS (---); 0,8 mg / ml LPS (- · - · -); 1,6 mg/ml LPS (- · · -).

3.6 Caratterizzazione strutturale del peptide rApoE_{PM} (133-167)

Una volta determinato che rApoE_{PM} (133-167) ha azione tossica nei confronti dei batteri e ipotizzando che tale azione fosse correlata alla capacità del peptide di strutturarsi in prossimità della membrana bersaglio, si è deciso di eseguire una caratterizzazione strutturale di ApoE(133-167) mediante studi di dicroismo circolare.

Dagli spettri registrati (Fig.18), analizzando la conformazione assunta da ApoE(133-167) in presenza di SDS e TFE si è possibile evidenziare la capacità da parte del peptide di assumere una conformazione ad α -elica solo in presenza di tali agenti, mentre appariva completamente destrutturato in tampone. Il peptide rApoE_{PM} (133-167) in soluzione non presenta una struttura secondaria definita, come chiaramente indicato dalla presenza di un minimo di assorbimento a 200 nm, mentre in presenza di molecole organiche in grado di indurre la strutturazione delle proteine come l'SDS e il TFE, assume una strutturazione ad α -elica, caratterizzata dalla presenza di due minimi (208 nm e 222 nm).

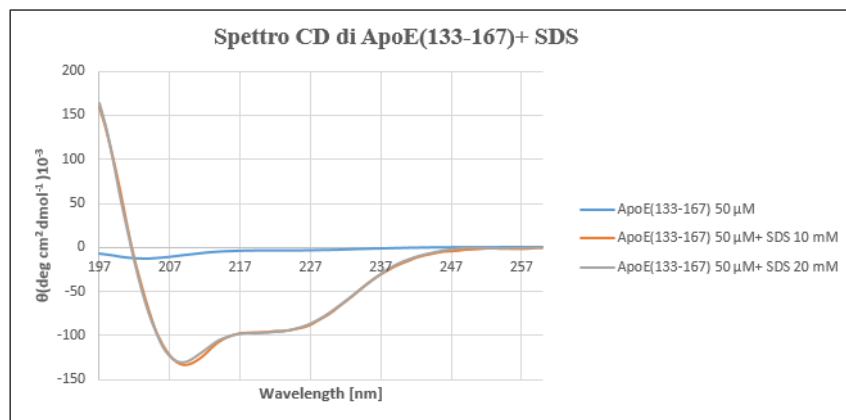


Fig. 18: Spettri dicroici di ApoE(133-167) In azzurro è registrato lo spettro del solo peptide ApoE(133-167) in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4; in arancione lo spettro del peptide in presenza di SDS 10 mM in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4; in grigio il peptide in presenza di SDS 20 mM in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4.

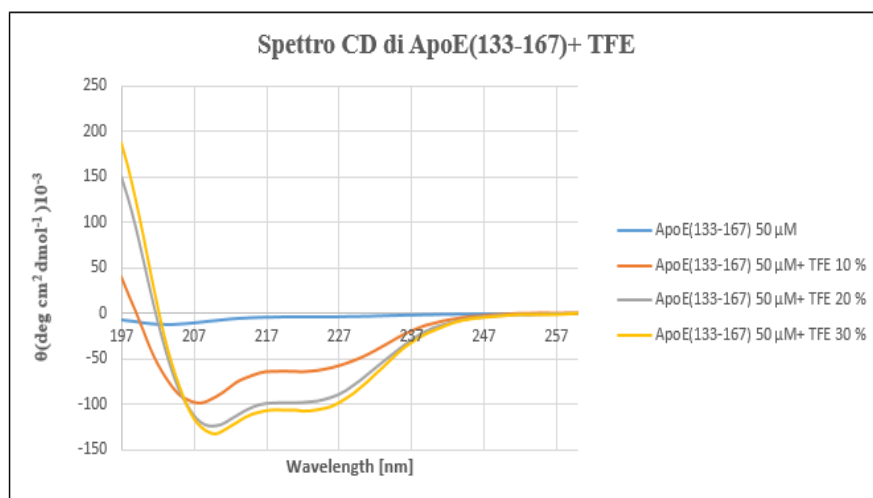


Fig. 19 : Spettri dicroici di ApoE(133-167) In azzurro è registrato lo spettro del solo peptide ApoE(133-167) in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4, in arancione lo spettro del peptide in presenza di TFE 10 % in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4, in grigio il peptide in presenza di TFE 20 % in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4 e in giallo il peptide in presenza di TFE 30% in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4.

Un'ulteriore caratterizzazione strutturale di rApoE_{PM} (133-167) mediante CD è stata condotta analizzando il comportamento del peptide in presenza di LPS.

In Fig.20 è mostrato il risultato della sovrapposizione degli spettri ottenuti titolando rApoE_{PM} (133-167) con LPS isolato da *P. aeruginosa* ceppo KK27 in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4.

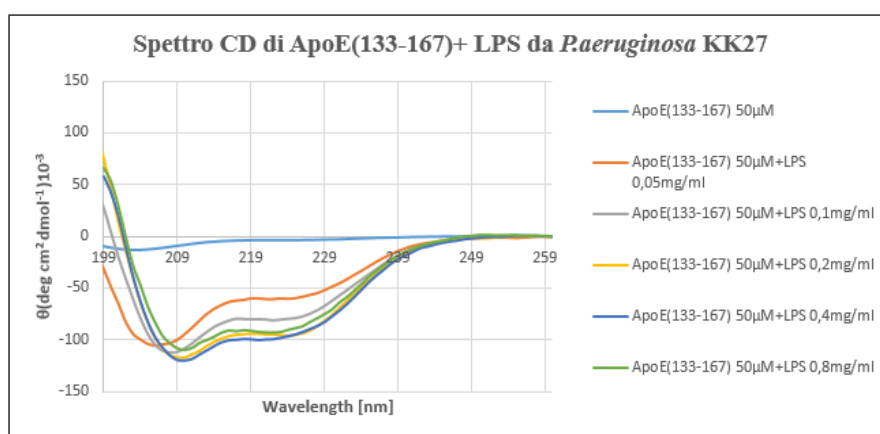


Fig. 20: Spettri dicroici di ApoE(133-167) In azzurro è registrato lo spettro del solo peptide ApoE(133-167) in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4, in arancione lo spettro del peptide in presenza di LPS 0.05 mg/ml in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4, in grigio il peptide in presenza di LPS 0.1 mg/ml in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4, in giallo il peptide in presenza di LPS 0.2 mg/ml in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4, in blu lo spettro del peptide in presenza di LPS 0.4 mg/ml in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4 e in verde lo spettro del peptide in presenza di LPS 0.8 mg/ml in fosfato di sodio 10 mM pH 7.4.

Gli spettri dicroici rappresentati nelle figure 19 e 20, evidenziano che rApoE_{PM} (133-167) è in grado di assumere una conformazione ad α -elica in presenza di LPS. Questo dato permette di ipotizzare che il peptide, oltre ad essere antimicrobico possiede potenziali proprietà immunomodulatorie.

3.7 Saggi di citotossicità di rApoE_{PM} (133-150)

L'interesse nell'uso degli AMPs in alternativa agli antibiotici tradizionali deriva principalmente dalla loro azione selettiva sulle cellule batteriche. Si è pensato, quindi, di studiare l'effetto citotossico di rApoE_{PM} (133-150) e della sua forma sintetica su diverse linee cellulari umane sia in sospensione che in aderenza. In figura 22 è rappresentato il risultato del saggio di citotossicità condotto su monociti umani THP-1. Come evidenziato in figura l'aggiunta di concentrazioni crescenti (1, 5, e 10 μ M) di rApoE_{PM} (133-150) o sApoE (133-150) alle cellule THP-1, a tre differenti tempi di incubazione, non ha comportato alcuna riduzione significativa della vitalità cellulare. Entrambi i peptidi hanno mostrato lo stesso comportamento, avvalorando ulteriormente la considerazione che i due residui supplementari (Pro-Met) presenti nel peptide ricombinante non influiscono in alcun modo sulla sua attività biologica. La citotossicità di rApoE_{PM} (133-150) è stata misurata anche nei confronti di macrofagi, cheratinociti (cellule HaCaT) e su tre linee di cellule tumorali umane (HeLa, HEK e Caco-2), non denotando in nessun caso significativi valori di citotossicità.

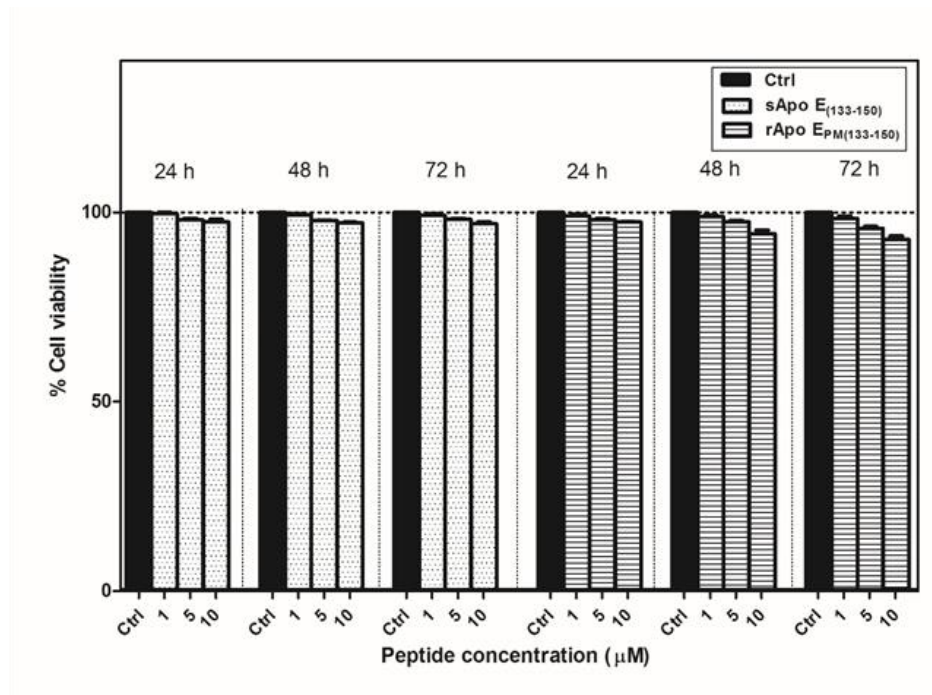


Fig.22: Effetto di sApoE (133-150) o rApoE_{PM} (133-150) sulla vitalità delle THP- 1 cellule. I valori riportati sono le medie di tre esperimenti condotti indipendentemente.

3.8 Saggi di citotossicità di rApoE_{PM} (133-167)

Mediante il saggio di MTT è stato valutato anche il possibile effetto citotossico di ApoE_{PM}(133-167). I saggi sono stati effettuati su cellule tumorali umane (HeLa), su cheratinociti umani immortalizzati (HaCat), su cardiomiociti di ratto (H9c2) e anche sui monociti umani (Thp1). Per questa ultima linea cellulare non è stato necessario attendere l'adesione delle cellule, perché esse crescono in sospensione

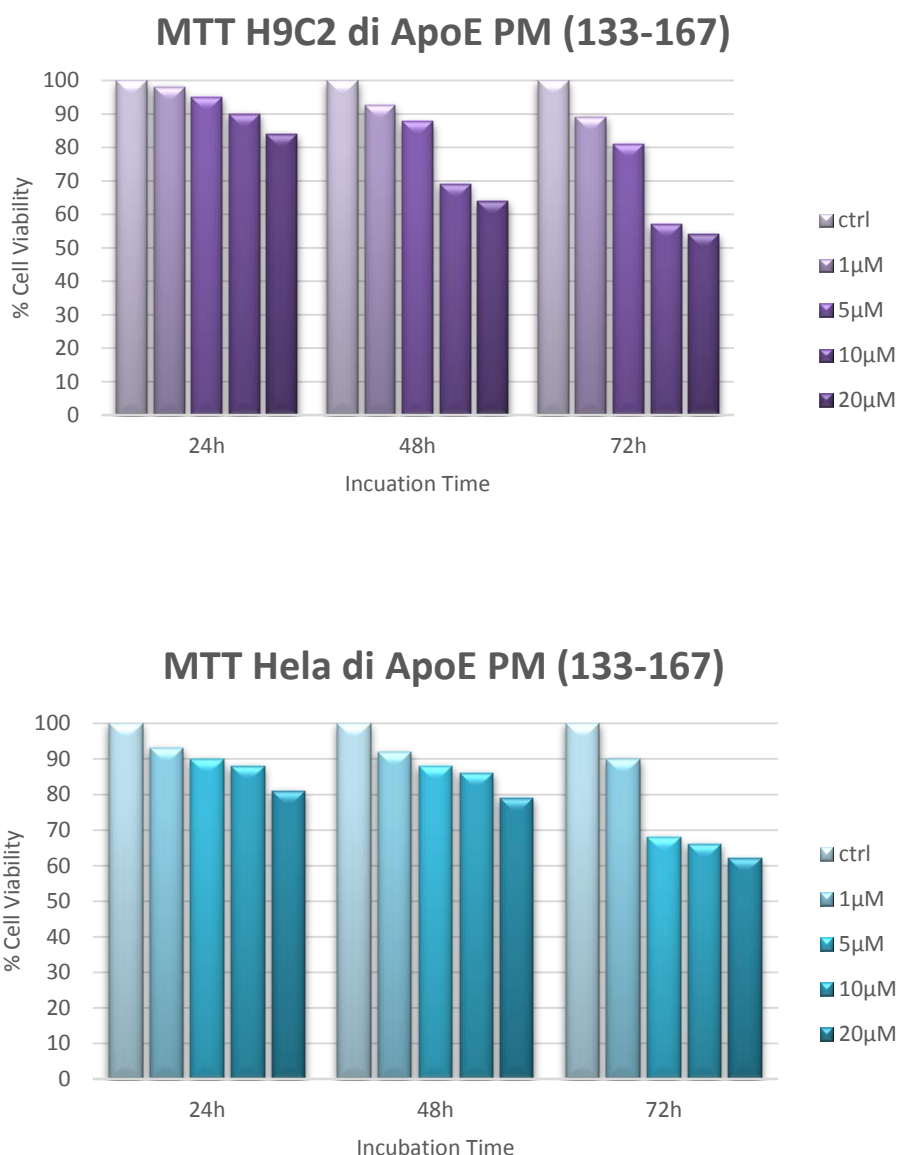


Fig. 23: Effetto d rApoE_{PM} (133-167) sulla vitalità delle cellule H9C2 e HeLa. I valori riportati sono le medie di tre esperimenti condotti indipendentemente.

L'esperimento è stato effettuato anche su cellule HaCat (dati non mostrati) e i risultati hanno evidenziato comportamenti simili a quelli sopra descritti in riferimento alle cellule H9c2 e HeLa.

In figura 24 sono riportati i dati ottenuti dal saggio effettuato sui monociti umani (Thp1). In questo caso va sottolineato che a concentrazioni elevate (rispetto alle MIC) i segni di citotossicità compaiono già a 48 ore dall'incubazione, mentre a concentrazioni analoghe ai valori di MIC il peptide non presenta una citotossicità significativa.

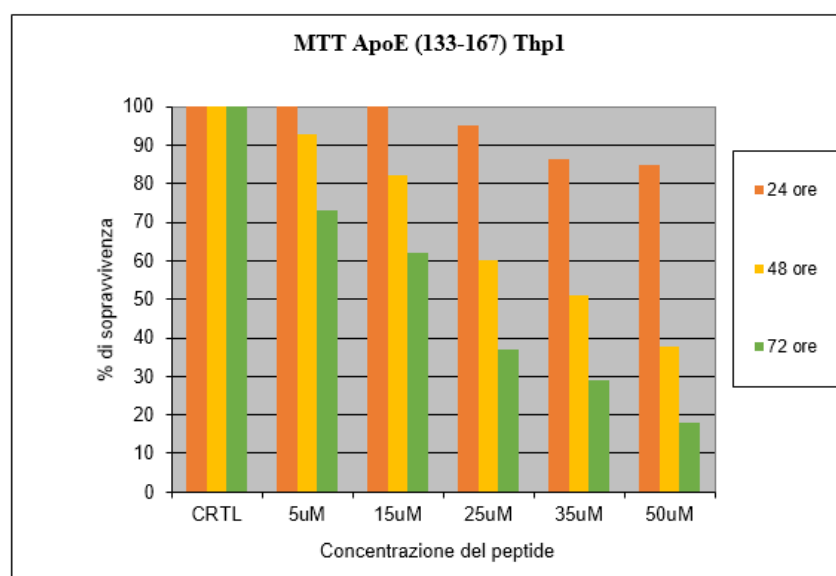


Fig. 24: Analisi dei dati su monociti umani non differenziati. Sull'asse delle ascisse è indicata la concentrazione del peptide, mentre sull'asse delle ordinate è indicata la percentuale di sopravvivenza.

I dati ottenuti dimostrano come, su tutte le linee cellulari utilizzate, l'attività citotossica di rApoE_{PM} (133-167) sia trascurabile nell'arco delle 24 ore e che nella maggior parte delle linee cellulari anche a 48 ore. I primi segni di tossicità iniziano a manifestarsi dopo 48 ore ma solo a concentrazioni molto elevate di rApoE_{PM} (133-167), mentre dopo 72 ore i segni di sofferenza cellulare risultano evidenti in quasi tutte le linee cellulari utilizzate sebbene sempre a concentrazioni di peptide più elevate rispetto ai valori di MIC.

3.9 Saggi di emolisi rApoE_{PM} (133-150) e rApoE_{PM} (133-167)

L'emolisi è il termine comunemente usato per descrivere i danni ai globuli rossi che portano alla fuoriuscita del ferro contenuto nell'emoglobina, condizione pericolosa per la vita in quanto può portare ad alcune malattie come l'anemia.

Poiché è ampiamente riportato che diversi peptidi antimicrobici presentano una non trascurabile attività emolitica, si è deciso di verificare se rApoE_{PM} (133-150) e rApoE_{PM} (133-150) presentassero tale attitudine. A tal riguardo eritrociti di *Mus musculus* sono stati sottoposti all'azione dei peptidi, anche a concentrazioni di 10 volte superiori alle MIC. Come si può osservare nelle figure 25 e e26, sia il peptide rApoE_{PM} (133-150) che rApoE_{PM} (133-150) dopo un'ora di incubazione esercitavano un'attività emolitica del tutto trascurabile, non superiore al 1%.

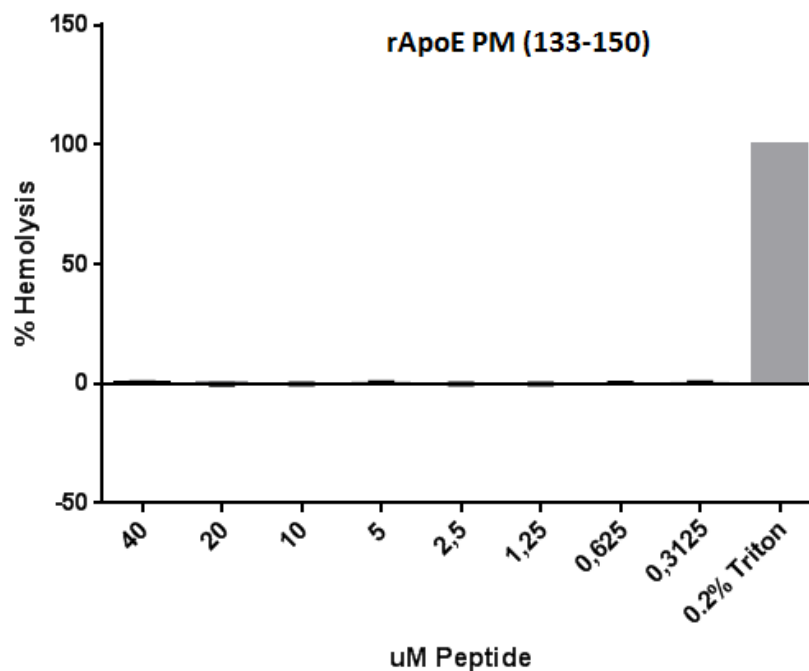


Fig.25: Saggio di emolisi del peptide rApoE_{PM} (133-150) su eritrociti di *Mus musculus*. Controllo: cellule incubate per 60 minuti in presenza di Triton 0.2%.

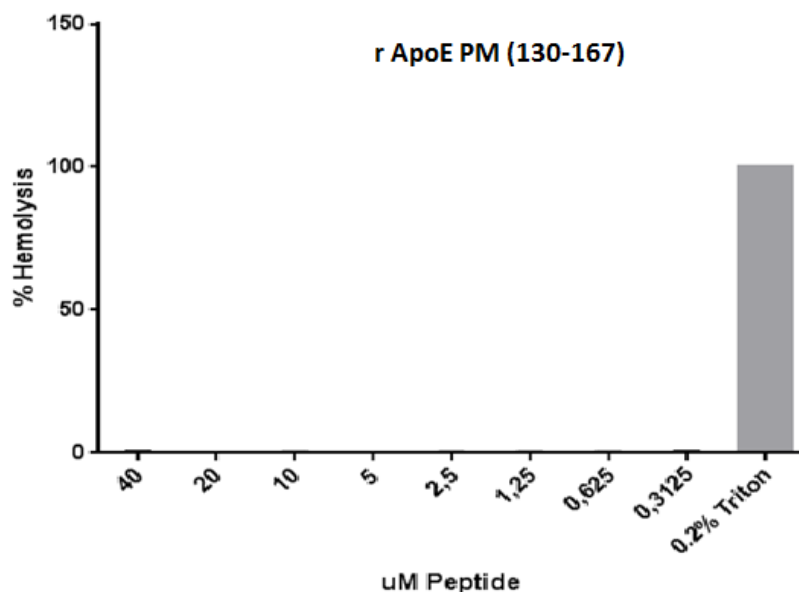


Fig. 26: In figura sono stati riportati i dati ottenuti dal saggio di emolisi di ApoE(133-167).

I dati ottenuti indicano la totale assenza di tossicità nei confronti degli eritrociti da parte del peptide, anche a concentrazioni superiori ai valori di MIC riportati in tabella 3.

3.10 Analisi delle proprietà immunomodulanti del peptide ApoE_{PM} (133-150)

È noto che molti AMPs hanno la capacità di bloccare la produzione di citochine prodotte in risposta all'LPS; tale proprietà può essere espletata direttamente nella regolazione della cascata di reazioni di inibizione cellulare (58) oppure interferendo direttamente sulle capacità di legame dell'LPS con i propri target (59). Al fine di studiare le eventuali proprietà immunomodulatorie di rApoE_{PM} (133-150) su cellule umane, si è deciso di analizzare mediante qRT-PCR gli effetti del peptide sull'espressione di due citochine, Il-8 e COX-2, in cellule umane THP-1, indifferenziate o differenziate in macrofagi, pre-trattate con LPS.

Come mostrato in Figura 19, in macrofagi trattati con rApoE_{PM} (133-150) dopo la stimolazione con LPS, è stata osservata una forte diminuzione della espressione dell'mRNA sia di Cox-2 e che di Il-8 (riduzione dell'espressione del 64% e del 74%, rispettivamente). Un effetto analogo è stato osservato sulle stesse cellule pretrattate con LPS, in presenza del peptide r(P)GKY20 (Fig. 19A-B). Al contrario su cellule THP-1 non differenziate, pretrattate con LPS, rApoE

PM (133-150) sembra non esercitare effetti rilevanti sull'espressione delle due citochine prese in esame (Fig. 27A-B).

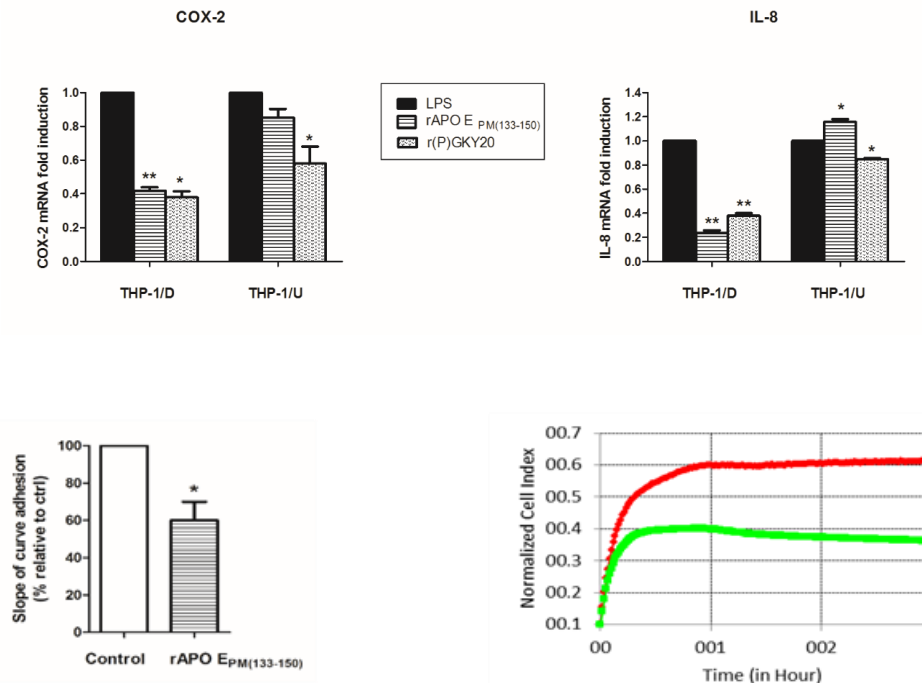


Fig.27: Influenza di ApoE PM (133-150), in cellule THP-1 pre-trattate con LPS, sull'espressione dei geni COX-2 (pannello A) e IL-8 (Pannello B) e l'adesione cellulare (pannello C). Pannelli A e B: l'RNA totale è stato isolato da due diverse linee di cellule THP-1/D (forma differenziata) e THP-1/U (forma indifferenziata). Cellule pre-trattate solo con LPS (barre nere) e dopo esposizione a rApoE PM (133-150) (barre bianche con linee orizzontali) oppure con r(P)GKY-20 (barre bianche). I risultati sono stati espressi come relativa espressione rispetto all'espressione genica dell'actina per A) COX-2 e B) IL-8. I dati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti \pm SE. Pannello C: curva dell'aderenza. Le cellule di THP-1 trattate con LPS, sono state incubate con rApoE PM (133-150) 3 μ M in un intervallo di tempo compreso tra 0-3 ore. Pannello D è stata riportata una curva di adesione risultante. I risultati sono presentati come percentuale di pendenza delle cellule aderenti nei confronti del controllo e sono espressi come media \pm SE di tre esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato. La significatività statistica è stata calcolata sulla base di test t, fronte-retro (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Sebbene ApoE PM (133-150) non sembra avere un effetto significativo sull'espressione di Cox-2 e di IL-8 in cellule THP-1 indifferenziate, va comunque sottolineato che esso è in grado di alterare le capacità di adesione di queste cellule se sottoposte all'azione dell'LPS. Questa azione è probabilmente dovuta alle capacità di ApoE PM (133-150) di esercitare un effetto sulle proprietà strutturali della membrana plasmatica e quindi di indurre una risposta

immunitaria alternativa all'azione anti-infiammatoria che invece il peptide esercita sui macrofagi sottoposti al trattamento con LPS.

Gli effetti di rApoE_{PM} (133-150) sull'adesione indotta da LPS di cellule THP-1 (vedi figura 19 C e D) è stato determinato dopo 3 ore di trattamento con RTCA (vedi metodi). L'aggiunta di rApoE_{PM} (133-150) 3 μ M induce un'alterazione della curva sperimentale di controllo (adesione di cellule indifferenziate di THP - 1 in assenza di peptide), indicando così una riduzione della capacità delle THP-1 pretrattate con LPS di aderire alla superficie della piastra (Fig. 27C). Lo stesso effetto delle capacità di adesione per le THP-1 è stata osservata su piastre rivestite con fibronectina dopo 7 ore (dati non mostrati).

Per indagare ulteriormente le proprietà immunomodulanti di ApoE (133-150), cellule mononucleate periferiche (PBMC) sono state isolate da donatori di sangue ed è stata analizzata mediante un dosaggio ELISA la quantità di TNF- α rilasciata in cellule trattate con LPS in presenza di dosi crescenti di sApoE (133-150). Come controllo positivo è stato utilizzato un peptide sintetico di cui già sono note proprietà immunomodulanti chiamato IDR -1018 (60).

Come mostrato in Figura 28A, le PBMC trattate con LPS e con sApoE (133-150) hanno evidenziato una significativa riduzione del rilascio di TNF- α , simile a quello determinato in cellule trattate con IDR - 1018.

E' stata inoltre analizzata sempre nell'ambito della capacità di ApoE (133-150) di agire sul sistema immunitario dell'ospite, la sua capacità di indurre il rilascio di MCP-1 (proteina-1 chemiotattica da monociti), un membro della famiglia delle chemochine coinvolte principalmente nella migrazione dei leucociti (61) al sito dove di infezione. Come mostrato nella Figura 20B, l'aggiunta di quantità crescenti di sApoE (133-150) su cellule PBMC causava un rilascio dose-dipendente di MCP-1, paragonabile a quello ottenuto con simili quantità di IDR -1018.

Sulla base di questo risultato, è stato ipotizzato che il peptide ApoE (133-150) potrebbe rivestire un ruolo nella promozione della migrazione e il reclutamento di monociti/macrofagi in risposta all'infiammazione.

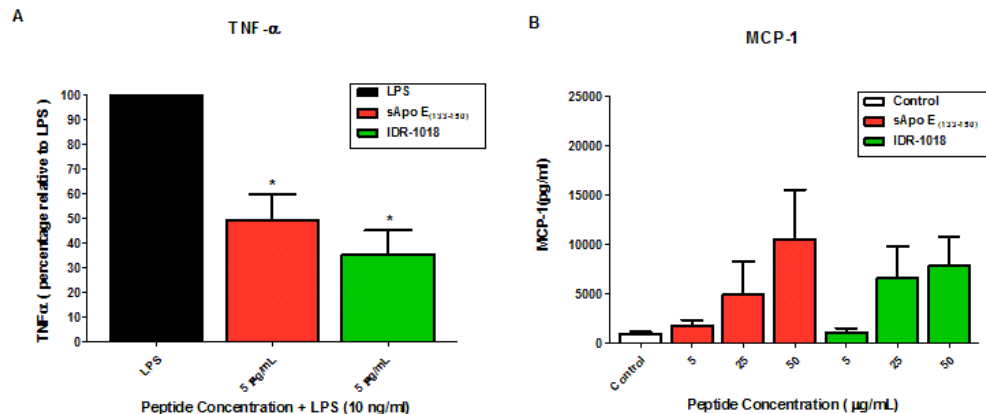


Fig.28: Risposta Immunitaria di cellule periferiche mononucleari di sangue umano (PBMC) mediata da rApoE_{PM} (133-150). Pannello A. Riduzione dell'espressione della citochina TNF- α indotta da LPS. Le cellule PBMC sono state stimulate con 10 ng/ml di LPS da *P.aeruginosa* e in seguito trattate con sApoE_{PM} (133-150) e con il peptide IDR-1018. Il rilascio di TNF- α è stato misurato mediante ELISA dopo 24 ore di incubazione. L'attività dei peptidi è stata riportata come percentuale di TNF- α rilasciata dopo il trattamento con peptidi rispetto al TNF- α rilasciata da cellule stimulate con LPS. Pannello B. Induzione della chemochina MCP-1. Cellule di PBMC sono state trattate con sApoE_{PM} (133-150) o con il peptide IDR-1018, a tre diverse concentrazioni. Il rilascio di MCP-1 è stato misurato mediante ELISA dopo 24 ore di incubazione. L'attività dei peptidi espressa come quantità di MCP-1 rilasciata rispetto alle cellule non trattate (controllo). I risultati rappresentano media \pm SEM di tre donatori indipendenti. La significatività statistica è stata calcolata sulla base del t-test (* = $p < 0.05$ rispetto al LPS)

Infine, poiché la proteina ApoE è prodotta anche dalle cellule della pelle [62], e poiché la patogenesi di molte malattie infiammatorie della pelle induce una risposta immunitaria che coinvolge cheratinociti, cellule immunitarie e mediatori solubili [63], si è pensato di verificare eventuali proprietà immunomodulatorie di rApoE_{PM}(133-150) su cheratinociti umani. A tal proposito è stata analizzata l'espressione delle citochine pro-infiammatorie (COX-2 e IL-8, entrambe descritte in seguito) in cellule HaCat pretrattate con LPS.

I risultati mostrati in Figura 21 dimostrano chiaramente che rApoE_{PM} (133-150) è in grado di attenuare in maniera marcata l'espressione di entrambi

i geni codificanti per COX - 2 e IL - 8. Risultati simili sono stati ottenuti anche con il peptide sApoE (133-150) (dati non riportati).

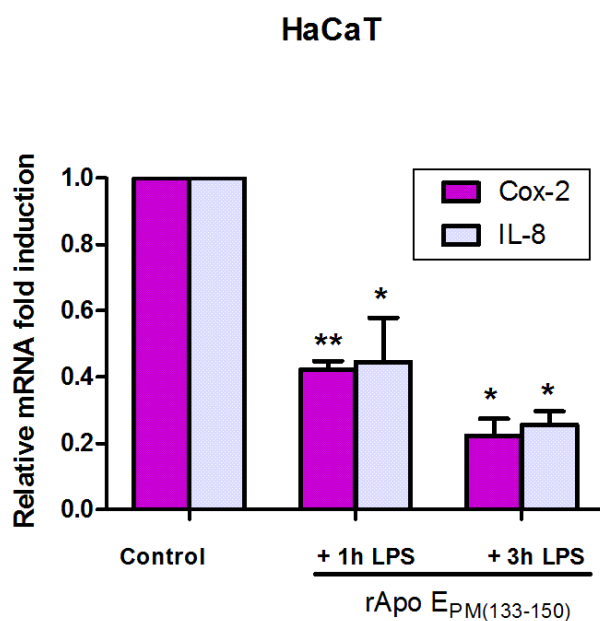


Fig.29: Influenza di rApoE (133-150), sull'espressione di COX-2 e IL-8, in cellule HaCaT pretrattate con LPS. L'RNA totale è stato isolato da cheratinociti umani (HaCaT) pretrattati con LPS ed esposti per 1 ora o 3 ore a rApoE_{PM(133-150)}. I risultati sono stati espressi come induzione relativa rispetto al 18S. Dati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti \pm SE. La significatività statistica è stata calcolata sulla base del t-test (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ rispetto a cellule di controllo non trattate).

3.11 Analisi delle proprietà immunomodulatorie di rApoE_{PM} (133-167)

Il grado di infiammazione in presenza di rApoE_{PM} (133-167) è stato verificato mediante *RT-PCR*. Questa tecnica è stata scelta per seguire l'espressione dell'interleuchina 8 (IL-8) e della cicloossigenasi 2 (COX-2).

COX-2 è nota anche come prostaglandina sintasi 2 ed è un enzima inducibile, presente solo durante i processi infiammatori nei tessuti colpiti. Per tale motivo COX è un bersaglio dei farmaci antiinfiammatori non steroidei (FANS). Essendo quindi COX-2 espresso esclusivamente in risposta al processo infiammatorio, è un ottimo strumento per valutare il livello di infiammazione in seguito a trattamento con LPS e l'eventuale diminuzione dell'infiammazione in seguito alla somministrazione del peptide.

L'interleuchina 8 è una chemochina molto importante nella mediazione della risposta immunitaria, che diversi tipi cellulari immagazzinano nelle vescicole di secrezione, i corpi di Weibel-Palade, che attraverso una cascata di reazioni vengono secrete. L'IL-8 conosciuta anche come fattore chemotattico per i neutrofili, induce chemotassi delle cellule bersaglio che migrano verso il sito di infezione. L'IL-8 è anche conosciuta per essere un potente promotore dell'angiogenesi. Nelle cellule bersaglio, l'IL-8 induce una serie di risposte fisiologiche richieste per promuovere la migrazione come l'aumento della concentrazione di Ca²⁺ intracellulare, l'esocitosi (rilascio dell'istamina) e un *burst* ossidativo. Per questo motivo IL-8 può essere seguita, in seguito a trattamento infiammatorio con LPS da *P. aeruginosa* P10 e valutare l'eventuale abbassamento dei suoi livelli di espressione in seguito a somministrazione di ApoE(133-167).

In figura 30 è mostrato i dati ottenuti per valutare i livelli di espressione dei geni IL-8 e COX-2.

Si osserva in entrambe le figure un abbassamento dei livelli delle citochine prese in esame in cellule HaCat sottoposte a trattamento con LPS

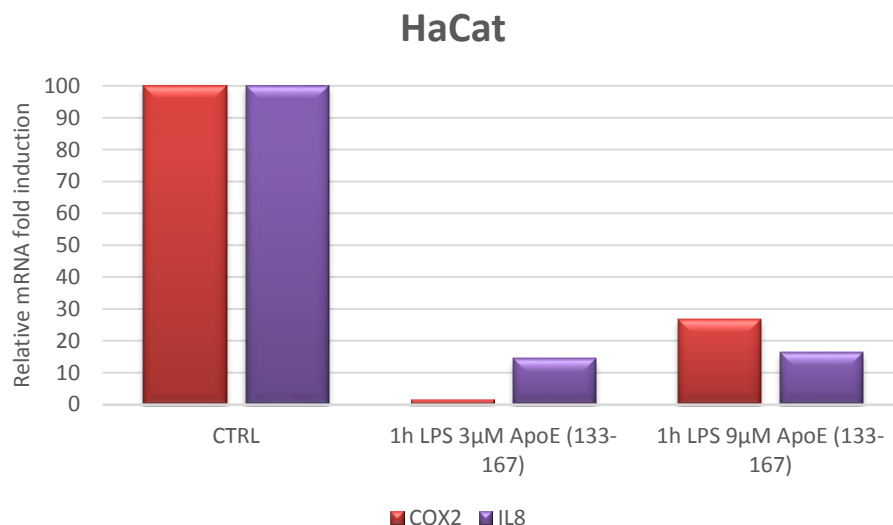


Fig. 30: Sull'asse delle x sono riportate le condizioni utilizzate, mentre sull'asse delle y sono riportati i livelli di COX-2 e IL8 utilizzando come riferimento i livelli di COX-2 e IL8 rilevati inseguito a trattamento con LPS.

3.12 Saggio di Griess

Un importante mediatore citotossico dell'infiammazione acuta e cronica è l'ossido nitrico (NO), il cui aumento si osserva in pazienti con sepsi, endotossinemia (ossia la presenza nel sangue di endotossine derivate da batteri gram-negativi) e reazioni a corpi estranei [64][65]. Nel corso dell'infezione, si riscontra nel siero e nell'urina dei pazienti un aumento dei livelli di NO sotto forma di nitriti e nitrati [65]. Allo scopo di valutare eventuali proprietà inibitorie nel rilascio di NO da parte dei peptidi ApoE (133-150) e ApoE (133-167), sono stati condotti esperimenti mediante la tecnica di Griess (vedi Metodi) su macrofagi di *Mus musculus* Raw 264.7. Sono stati utilizzati al riguardo due approcci alternativi: in un caso, cellule preventivamente infettate con LPS (50 ng/mL) da *Salmonella* e successivamente incubate per 1 ora in presenza del peptide (2 diverse concentrazioni - 5 e 20 μM); nel secondo caso le cellule venivano incubate in una miscela costituita da LPS (50 ng/mL) e peptide (5 o 20 μM). Le cellule trattate unicamente con LPS rappresentavano il controllo positivo, mentre le cellule nel mezzo di coltura rappresentavano il controllo negativo.

Dai risultati illustrati in figura 32, si può notare che ApoE (133-150) è in grado di attenuare la produzione di NO solo se aggiunto in seguito a infezione, mentre se è aggiunto in combinazione all'LPS determina addirittura un aumento nella produzione di NO.

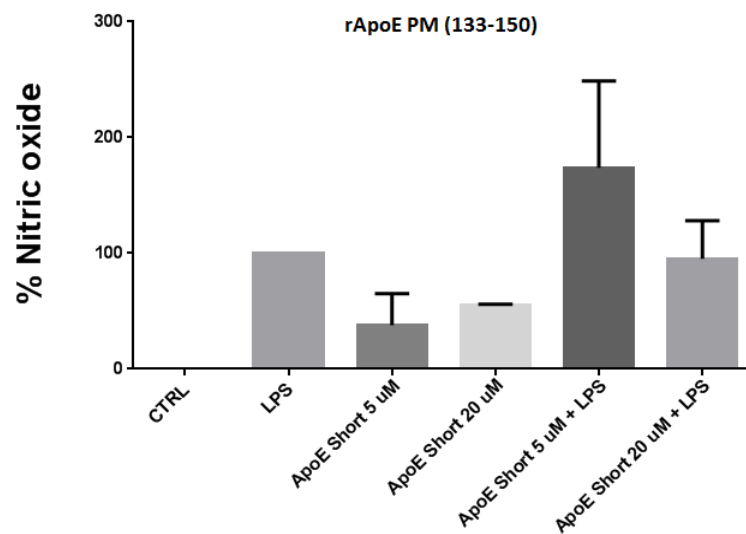


Fig.32: Produzione di NO da parte di macrofagi RAW 264.7 cresciuti in presenza del solo LPS, ApoE (133-150) e della combinazione dei due, dati analizzati dopo 24 di incubazione.

Il risultato ottenuto per ApoE(133-167) è invece diverso perché in questo caso il peptide non è in grado di attenuare l'infiammazione indotta da LPS ma al contrario sembra addirittura aumentare il livello di infiammazione (Fig. 33)

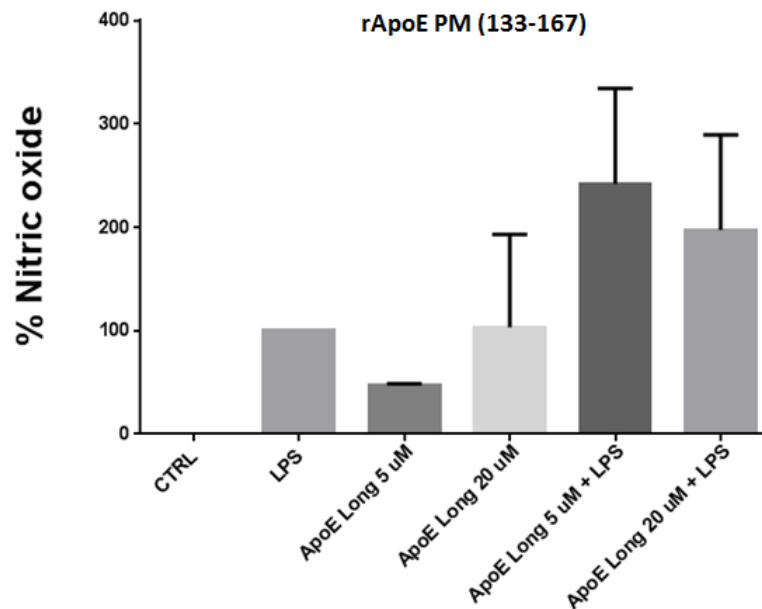


Fig.33: Produzione di NO da parte di macrofagi RAW 264.7 cresciuti in presenza del solo LPS, ApoE (133-167) e della combinazione dei due, dati analizzati dopo 24 di incubazione.



CAPITOLO 4: DISCUSSIONE



Discussione

I peptidi antimicrobici cationici (AMPs) sono elementi ancestrali del sistema immunitario innato e sono praticamente presenti in tutti gli organismi multicellulari. La maggioranza degli AMPs ha caratteristiche biochimiche comuni, tra cui dimensioni relativamente piccole, cationicità e anfipaticità. Queste caratteristiche sono essenziali per la loro attività antimicrobica perché consente loro di interagire e danneggiare in maniera selettiva solo le membrane batteriche.

E' ampiamente riportato in letteratura che numerose proteine umane, le cui funzioni principali non sono necessariamente legate alla difesa dell'ospite, presentano all'interno della loro sequenza regioni che hanno composizione simile a quella degli AMPs e che una volta rilasciate in forma di peptidi mostrano proprietà chimico fisiche e biologiche indistinguibili da quelle degli AMP convenzionali [52-54]. Questi AMP, che possono essere definiti "criptici", hanno attirato l'interesse di ricercatori per molte ragioni diverse. In primo luogo l'esistenza di AMP criptici suggerisce che l'immunità innata è molto complessa e comprende più componenti di quanto finora pensato. Gli effetti immunomodulatori di questi AMP supportano ulteriormente l'idea che immunità adattativa e innata siano strettamente co-regolate. Infine, l'esistenza di AMP criptici suggerisce che il proteoma umano possa essere una fonte ancora inesplorata di peptidi bioattivi con potenziali applicazioni farmacologiche.

L'apolipoproteina E (ApoE) è un esempio particolarmente interessante di proteina contenente una sequenza AMPs criptica. Per lungo tempo, ApoE è stata considerata semplicemente un trasportatore di lipidi in generale e in particolare del colesterolo. Tuttavia, numerosi studi recenti hanno evidenziato che possiede anche attività anti-infiammatoria, antivirale e attività antimicrobiche [55-57]. Ancora più interessante è che i peptidi individuati nella regione di legame del recettore di ApoE conservano alcuni delle più interessanti attività farmacologiche proprie della proteina intatta. Ad esempio, il peptide ApoE (133-149), noto anche come COG-133, ed il peptide ApoE (133-162) mostrano rispettivamente attività antinfiammatoria/neuroprotettiva ed attività antimicrobica [58,59]. Alcuni ricercatori hanno progettato peptidi artificiali, ApoEdp e ApoE23, contenenti regioni di ApoE ripetute in tandem che mostrano attività antimicrobica e anti-infiammatoria [48,49].

Durante il mio lavoro di ricerca si è cercato di dimostrare che un peptide, derivante dalla regione 133-150 del dominio di legame al recettore di ApoE, e la sua forma allungata, contenuta tra i residui 133-167, possedessero sia attività antimicrobica che immunomodulanti. Gli esperimenti descritti in questo lavoro dimostrano che le forme sintetiche dei peptidi e le rispettive forme ricombinanti possiedono un forte potere antibatterico nei confronti di diversi ceppi sia di laboratorio che patogeni, come *P. aeruginosa* isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica, pur non avendo effetti citotossici significativi sulla vitalità cellulare di diverse linee cellulari umane. Tale dato è stato dimostrato sia per il peptide di lunghezza ridotta sia per il peptide di lunghezza maggiore. Da un punto di vista strutturale, in accordo con le proprietà canoniche della maggior parte delle AMP, è stato verificato mediante dicroismo circolare che entrambi i peptidi tendono ad assumere una conformazione ben definita solo in presenza di agenti che mimano la membrana batterica e restano non strutturati in tampone acquoso. Inoltre i nostri risultati hanno

dimostrato che ApoE (133-150), riduce in modo significativo l'espressione indotta dall'LPS di IL-8, TNF- α e Cox-2 in cellule differenziate THP-1, e induce il rilascio di citochine chemio tattica (MCP-1) da PBMC. Inoltre, è stato dimostrato che entrambi i peptidi possiedono una marcata attività immunomodulatoria in linee cellulari di cheratinociti umani, aprendo un nuovo scenario sulla futura applicazione topica di AMP umani.

In conclusione, i nostri dati su ApoE_{PM} (133-150) e ApoE_{PM} (133-167) aggiungono nuovi dettagli per lo sviluppo di nuovi farmaci antibatterici alternativi agli antibiotici tradizionali. Rispetto ad altri agenti antimicrobici i peptidi presentano una serie di vantaggi in quanto riducono la probabilità di indurre la comparsa di ceppi resistenti e allo stesso tempo contribuiscono a migliorare la risposta antinfiammatoria senza alterarne la vitalità cellulare. In virtù del loro diverso meccanismo d'azione, tali peptidi potrebbero essere utilizzati in combinazione con gli antibiotici tradizionali nel trattamento delle infezioni batteriche.

Bibliografia

1. Kulp A, Kuehn MJ (2010). "Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles". *Annu. Rev. Microbiol.* 64: 163–84. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073413. PMC 3525469. PMID 20825345.
2. Hershberger C, Binkley SB (1968). "Chemistry and metabolism of 3-deoxy-D-mannooctulosonic acid. I. Stereochemical determination". *J. Biol. Chem.* 243 (7): 1578–84. PMID 4296687.
3. Tzeng YL, Datta A, Kolli VK, Carlson RW, Stephens DS (May 2002). "Endotoxin of *Neisseria meningitidis* composed only of intact lipid A: inactivation of the meningococcal 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase". *J. Bacteriol.* 184 (9): 2379–88. doi:10.1128/JB.184.9.2379-2388.2002. PMC 134985. PMID 11948150.
4. N Lamping, R Dettmer, N W Schröder, D Pfeil, W Hallatschek, R Burger, and R R Schumann(1998) LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *J Clin Invest.* May 15; 101(10): 2065–2071
5. Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J (1998). "A critical role of naturalimmunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection". *J. Exp. Med.* 188 (12): 2381–6. doi:10.1084/jem.188.12.2381. PMC 2212438. PMID 9858525.
6. Chastain EM, Miller SD (2012). "Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease". *Immunol. Rev.* 245 (1): 227–38. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01076.x. PMC 3586283. PMID 22168423.
7. Boman HG - Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. (2003) *J Intern Med* 254:197-215
8. Thevissen K, Osborn RW, Acland DP, Broekaert WF. Specific binding sites for an antifungal plant defensin from *Dahlia* (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity.(2000) *Mol Plant Microbe Interact.* Jan;13(1):54- 61
9. Boman HG - Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. (2003) *J Intern Med* 254:197-215.
10. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009 Mar;30(3):131-41
11. Tomasinsig L, Skerlavaj B, Papo N, Giabbai B, Shai Y, Zanetti M.- Mechanistic and functional studies of the interaction of a proline-rich antimicrobial peptide with mammalian cells. (2006) *J Biol Chem.* 6;281(1):383- 91.
12. Jerala R, Porro M. Endotoxin neutralizing peptides. (2004) *Curr Top Med Chem.*;4(11):1173-84. Review
13. McPhee JB, Hancock RE. Function and therapeutic potential of host defence peptides. *J Pept Sci.* 2005 Nov;11(11):677-87. Review.
14. Zasloff MAntimicrobial peptides of multicellular organisms.(2002) *Nature* 415: 389-395.
15. Ulrich H.N. Dürr, U.S. Sudheendra, Ayyalusamy Ramamoorthy *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, LL-37, the only human member of the

cathelicidin family of antimicrobial peptides Volume 1758, Issue 9, Sept. 2006, Pages 1408–1425

16. Gidalevitz D; Ishitsuka Y; Muresan A S; Konovalov O; Waring A J; Lehrer R I; Lee K Y. - Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes.- (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100: 6302–6307

17. Yeaman, M. R.; Yount, N. Y. “Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance”. Pharmacol. Rev. 2003, 55, 27–55.

18. Shai Y., Oren Z., Diastereoisomers of cytolysins, a novel class of potent antibacterial peptides. - (1996) J Biol Chem. 1996 Mar 29;271(13):7305-8

19. Oren, Z. & Shai, Y. (1998) Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. Biopolymers 47, 451–463.

20. Maher S, McClean S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. Biochem Pharmacol. 2006 28;71(9):1289-98.

21. Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. Biochim Biophys Acta. 2008 Feb;1778(2):357-75. Review

22. Zhao, H., Mattila, J. P., Holopainen, J. M. & Kinnunen, P. K. Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin. (2001) Biophys. J. 81, 2979–2991

23. Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L. & Huang, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores (2001) Biophys J 81,1475-85

24. Westerhoff HV, Juretić D, Hendler RW, Zasloff M. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Sep;86(17):6597-601

25. Vaz Gomes, A.; de Waal, A.; Berden, J. A.; Westerhoff, H. V. - Biochemistry Electric potentiation, cooperativity, and synergism of magainin peptides in protein-free liposomes. (1993), 32, 5365–5372

26. Bierbaum G, Sahl HG. Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. Arch Microbiol. 1985 Apr;141(3):249-54

27. Shai Y Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. (2002) Biopolymers 66: 236–248.

28. Matsuzaki K, Yoneyama S, Murase O, Miyajima K. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. Biochemistry. (1996) 25;35(25):8450-6

29. Kasetty G, Papareddy P, Kalle M, Rydengard V, Walse B, Svensson B, Morgelin M, Malmsten M, Schmidtchen A (2011). The C-terminal sequence of several human serine proteases encodes host defense functions. J Innate Immun.; 3(5):471-82

30. Lee DY, Huang CM, Nakatsuji T, Thiboutot D, Kang SA, Monestier M, Gallo RL (2009). Histone H4 is a major component of the antimicrobial action of human sebocytes. J Invest Dermatol. Oct; 129(10):2489-96.

31. Beck WH, Adams CP, Biglang-Awa IM, Patel AB, Vincent H, Haas-Stapleton EJ, Weers PM (2013). Apolipoprotein A-I binding to anionic vesicles and lipopolysaccharides: role for lysine residues in antimicrobial properties. *Biochim Biophys Acta*. Jun; 1828(6):1503-10.
32. Katia Pane; Lorenzo Durante; Elio Pizzo; Mario Varcamonti; Anna Zanfardino; Valeria Sgambati; Antimo Di Maro; Andrea Carpentieri; Viviana Izzo; Alberto Di Donato; Valeria Cafaro; Eugenio Notomista (2015), Rational design of a carrier protein for the production of recombinant toxic peptides in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2016 Jan 25;11(1):e0146552. doi: 10.1371/journal.pone.0146552. eCollection 2016..
33. Mahley RW (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. Apr 29;240(4852):622-30
34. Teoh CL, Griffin MD, Howlett GJ (2011). Apolipoproteins and amyloid fibril formation in atherosclerosis. *Protein Cell*. Feb; 2(2):116-27
35. Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009). The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. Aug 13;63(3):287-303
36. Shi J, Zhao CB, Vollmer TL, Tyry TM, Kuniyoshi SM (2008). APOE epsilon 4 allele is associated with cognitive impairment in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. Jan 15;70(3):185-90
37. Coto-Segura P, Coto E, Alvarez V, Morales B, Soto-Sanchez J, Corao AI, Santos-Juanes J (2010). Apolipoprotein epsilon4 allele is associated with psoriasis severity. *Arch Dermatol Res*. Mar;302(2):145-9.
38. Baitsch D, Bock HH, Engel T, Telgmann R, Muller-Tidow C, Varga G, Bot M, Herz J, Robenek H, von Eckardstein A, Nofer JR (2011). Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. May;31(5):1160-8
39. Curtiss LK, Forte TM, Davis PA (1984). Cord blood plasma lipoproteins inhibit mitogen-stimulated lymphocyte proliferation. *J Immunol*. Sep; 133(3):1379-84
40. Tenger C, Zhou X (2003). Apolipoprotein E modulates immune activation by acting on the antigenpresenting cell. *Immunology*. Jul; 109(3):392-7
41. Riddell DR, Graham A, Owen JS (1997). Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the Larginine: nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. *J Biol Chem*. Jan 3; 272(1):89-95
42. van den Elzen P, Garg S, Leon L, Brigl M, Leadbetter EA, Gumperz JE, Dascher CC, Cheng TY, Sacks FM, Illarionov PA, Besra GS, Kent SC, Moody DB, Brenner MB (2005). Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature*. Oct 6; 437(7060):906-10
43. de Bont N, Netea MG, Demacker PN, Verschueren I, Kullberg BJ, van Dijk KW, van der Meer JW, Stalenhoef AF (1999). Apolipoprotein E knock-out mice are highly susceptible to endotoxemia and *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Lipid Res*. Apr; 40(4):680-5

44. Roselaar SE, Daugherty A (1998). Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. *J Lipid Res. Sep*; 39(9):1740-3
45. Marques MA, Owens PA, Crutcher KA (2004). Progress toward identification of protease activity involved in proteolysis of apolipoprotein e in human brain. *J Mol Neurosci.*;24(1):73-80
46. Elliott DA, Tsoi K, Holinkova S, Chan SL, Kim WS, Halliday GM, Rye KA, Garner B (2011). Isoformspecific proteolysis of apolipoprotein-E in the brain. *Neurobiol Aging. Feb*;32(2):257-71
47. Clay MA, Anantharamaiah GM, Mistry MJ, Balasubramaniam A, Harmony JA (1995). Localization of a domain in apolipoprotein E with both cytostatic and cytotoxic activity. *Biochemistry. Sep 5*; 34(35):11142-51
48. Forbes S, McBain AJ, Felton-Smith S, Jowitt TA, Birchenough HL, Dobson CB (2013). Comparative surface antimicrobial properties of synthetic biocides and novel human apolipoprotein E derived antimicrobial peptides. *Biomaterials. Jul*; 34(22):5453-64
49. Wang CQ, Yang CS, Yang Y, Pan F, He LY, Wang AM (2013). An apolipoprotein E mimetic peptide with activities against multidrug-resistant bacteria and immunomodulatory effects. *J Pept Sci. Dec*; 19(12):745-50
50. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA (1991). Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science. Jun 28*; 252(5014): 1817-22
51. Raussens V, Slupsky CM, Ryan RO, Sykes BD (2002). NMR structure and dynamics of a receptor-active apolipoprotein E peptide. *J Biol Chem. Aug 9*;277(32):29172-80
52. Futamura M, Dhanasekaran P, Handa T, Phillips MC, Lund-Katz S, Saito H (2005). Two-step mechanism of binding of apolipoprotein E to heparin: implications for the kinetics of apolipoprotein E/heparan sulfate proteoglycan complex formation on cell surfaces. *J Biol Chem. Feb 18*; 280(7): 5414-22
53. Laskowitz DT, Thekdi AD, Thekdi SD, Han SK, Myers JK, Pizzo SV, Bennett ER (2001). Downregulation of microglial activation by apolipoprotein E and apoE-mimetic peptides. *Exp Neurol. Jan*; 167(1):74-85
54. Sarantseva S, Timoshenko S, Bolshakova O, Karaseva E, Rodin D, Schwarzman AL, Vitek MP (2009). Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *PLoS One. Dec 7*; 4(12):e8191
55. Azuma M, Kojima T, Yokoyama I, Tajiri H, Yoshikawa K, Saga S, Del Carpio CA (2000). A synthetic peptide of human apoprotein E with antibacterial activity. *Peptides. Mar*;21(3):327-30
56. Subasinghage AP, O'Flynn D, Conlon JM, Hewage CM (2011). Conformational and membrane interaction studies of the antimicrobial peptide alyteserin-1c and its analogue [E4K]alyteserin-1c. *Biochim Biophys Acta. Aug*;1808(8):1975-84

57. Gopal R, Park JS, Seo CH, Park Y (2012). Applications of circular dichroism for structural analysis of gelatin and antimicrobial peptides. *Int J Mol Sci.* 13(3): 3229-44. doi: 10.3390/ijms13033229
58. Chan C, Burrows LL, Deber CM (2004). Helix induction in antimicrobial peptides by alginate in biofilms. *J Biol Chem.* Sep 10; 279(37): 38749-54
59. Scott MG, Rosenberger CM, Gold MR, Finlay BB, Hancock RE (2000). An alpha-helical cationic antimicrobial peptide selectively modulates macrophage responses to lipopolysaccharide and directly alters macrophage gene expression. *J Immunol.* Sep 15; 165(6):3358-65. PubMed PMID: 10975854.
60. Scott MG, Vreugdenhil AC, Buurman WA, Hancock RE, Gold MR (2000). Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *J Immunol.* Jan 15;164(2):549-53.
61. Wieczorek M, Jenssen H, Kindrachuk J, Scott WR, Elliott M, Hilpert K, Cheng JT, Hancock RE, Straus SK (2010). Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity. *Chem Biol.* Sep 24;17(9):970-80
62. Li FK, Davenport A, Robson RL, Loetscher P, Rothlein R, Williams JD, Topley N (1998). Leukocyte migration across human peritoneal mesothelial cells is dependent on directed chemokine secretion and ICAM-1 expression. *Kidney Int.* Dec;54(6):2170-83
63. Fenjves ES, Gordon DA, Pershing LK, Williams DL, Taichman LB (1989). Systemic distribution of apolipoprotein E secreted by grafts of epidermal keratinocytes: implications for epidermal function and gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov; 86(22):8803-7
64. Anstey NM1, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Manyenga D, Misukonis MA, Arnelle DR, Hollis D, McDonald MI, Granger DL (1996). Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med.* 1996 Aug 1;184(2):557-67.
65. Ochoa JB1, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg.* 1991 Nov;214(5):621-6.